

РЕЧКУНОВА НАДЕЖДА ИВАНОВНА

**МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ОБЪЕМНЫХ И МНОЖЕСТВЕННЫХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК**

1.5.4 – биохимия

Диссертация в виде научного доклада
на соискание учёной степени
доктора химических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант: Лаврик Ольга Ивановна

доктор химических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Жарков Дмитрий Олегович, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», заведующий лабораторией

Кубарева Елена Александровна, доктор химических наук, профессор
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, главный научный сотрудник

Волчо Константин Петрович, доктор химических наук, профессор РАН
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, главный научный сотрудник

Защита состоится «30» сентября 2022 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Диссертация в виде научного доклада разослана « » августа 2022 г

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В.В.

Общая характеристика работы

Актуальность и разработанность проблемы

Действие внутриклеточных метаболитов и экзогенных генотоксических факторов приводит к повреждениям геномной ДНК. Повреждения в ДНК возникают также вследствие ее внутренней неустойчивости, в первую очередь в результате спонтанного гидролиза N-гликозидных связей, и могут приводить к нарушениям основных процессов метаболизма ДНК, в том числе репликации и транскрипции, тем самым вызывая мутации, хромосомные aberrации, а также остановку клеточного цикла и апоптоз. Последствия повреждений ДНК могут быть причиной различных патологий человека, среди которых рак и нейродегенеративные заболевания. Для противостояния этим неблагоприятным последствиям в ходе эволюции возникли разнообразные системы репарации ДНК. Эффективность функционирования систем репарации ДНК зависит от множества факторов. Например, при старении организма наблюдается снижение эффективности работы систем репарации окислительных повреждений, приводящее к накоплению неисправленных повреждений в ДНК, что может вызывать мутации, переходящие в злокачественную трансформацию клеток.

Исследования механизмов репарации ДНК и их регуляции – важная научная проблема, решение которой напрямую связано как с пониманием стратегии поддержания генетической стабильности, так и с поиском оптимальных путей лечения онкологических и других заболеваний человека. При лечении онкозаболеваний используются препараты, направленно повреждающие ДНК. Терапевтический эффект таких воздействий зависит от эффективности систем репарации ДНК, среди которых важное место занимает эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). Характерной особенностью системы NER является способность удалять широкий спектр структурно различающихся повреждений ДНК. В частности, этот путь репарации является основным в клетках млекопитающих для удаления пиримидиновых димеров, образующихся под действием УФ-облучения, и объемных ДНК-аддуктов, возникающих в результате попадания химических канцерогенов либо применения химиотерапевтических средств.

В клетках эукариот существует два пути NER: общегеномная репарация (global genome repair, GG-NER), удаляющая повреждения во всей геномной ДНК, и репарация, связанная с транскрипцией (transcription coupled repair, TC-NER), с помощью которой происходит удаление повреждений в транскрибируемой цепи ДНК. Различие путей NER проявляется на этапе узнавания повреждения. Остановка РНК-полимеразы II на повреждении служит сигналом для сборки комплекса TC-NER. Узнавание повреждений системой GG-NER в течение долгого времени оставалось загадкой и породило множество гипотез, достоверность которых изменялась по мере накопления экспериментальных данных.

На момент начала исследований, представленных в диссертации, были известны основные белки комплекса GG-NER и стадии процесса, предложены несколько моделей узнавания повреждения, отличающихся порядком взаимодействия факторов с поврежденной ДНК. Остался нерешенным вопрос о том, какой из факторов репарации первым узнает повреждение, и, как следствие, какова последовательность сборки репарационного комплекса на поврежденной ДНК. В качестве одного из вероятных кандидатов на роль фактора, осуществляющего первичное узнавание повреждения в клетках человека, рассматривался гетеродимер XPC-RAD23B (белок пигментной ксеродермы C в комплексе с RAD23B – гомологом дрожжевого белка Rad23). Активно обсуждался механизм узнавания белками NER одиночных повреждений в огромном массиве геномной ДНК, и каким образом достигается универсальность этого процесса. В лаборатории активно развивался и применялся для исследования процессов репликации и эксцизионной репарации оснований ДНК метод фотоаффинной модификации с использованием ДНК, содержащих фотореакционноспособные арилазидозамещенные аналоги нуклеотидов. Такие объемные заместители имитируют повреждения, узнаваемые системой NER, и могут быть использованы для исследования взаимодействия факторов NER с поврежденной ДНК.

Помимо стадии узнавания, ключевым моментом процесса NER является сборка комплекса, осуществляющего вырезание поврежденного участка ДНК. На этой стадии происходит привлечение в комплекс репарации структурно-специфичных эндонуклеаз XPF-ERCC1 и XPG, расщепляющих поврежденную цепь ДНК с 5'- и 3'-сторон от повреждения соответственно. Неотъемлемыми компонентами этого, так называемого «предрасщепляющего», комплекса являются репликативный белок A (RPA) и белок пигментной ксеродермы A (XPA). Хотя точный состав и топография этого комплекса, а также роль RPA и XPA в его формировании до сих пор полностью не установлены, полученные в данном исследовании результаты позволили значительно продвинуться в решении этих вопросов. В работе также затронут вопрос о возможном участии белков, формирующих «предрасщепляющий» комплекс, в последующих этапах процесса.

Посттрансляционные модификации белков значительно влияют на их функциональную активность в клеточных процессах. Одна из таких модификаций – поли(ADP-рибозил)ирование, ковалентное присоединение к белкам полимера ADP-рибозы (PAR), катализируемое поли(ADP-рибоза)-полимеразой (PARP) в ответ на повреждение ДНК. Взаимодействие PARP1 – фермента, которому принадлежит основная активность в синтезе PAR, с белками эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) и его влияние на этот процесс активно изучались и изучаются, в том числе в нашей лаборатории. Роль PARP1 и синтеза PAR в процессе NER долгое время практически не рассматривалась, за исключением отдельных работ, на основании которых было сделано предположение о возможном участии

PARP1 в этом процессе репарации. Это предположение нашло подтверждение в экспериментах, выполненных в рамках представленной работы.

Исследования репарации множественных (кластерных) повреждений в основном касались повреждений ДНК, возникающих под воздействием ионизирующего излучения или интенсивного окислительного стресса. Рассматривалась репарация кластеров, представленных одноцепочечными разрывами и/или апуриновыми/апиримидиновыми (AP) сайтами. В представленной работе впервые сформулирована концепция кластеров, состоящих из повреждений разного типа, в том числе объемных, для репарации которых необходимо согласованное действие разных систем репарации. Эти исследования особенно актуальны в связи с предположением о кооперации процессов репарации объемных и окислительных повреждений.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью данной работы было установление закономерностей формирования комплексов белков на поврежденной ДНК на разных стадиях процесса эксцизионной репарации нуклеотидов, а также особенностей репарации повреждений кластерного типа, включающих объемные повреждения и AP-сайты.

В рамках проведенного исследования были поставлены и решены следующие задачи:

1. Конструирование модельных ДНК-структур, имитирующих субстраты и интермедиаты различных этапов процесса NER или содержащих повреждения кластерного типа.
2. Анализ ДНК, содержащих фотореакционноспособные арилазидозамещенные аналоги нуклеотидов, в качестве субстратов системы NER в экстрактах клеток человека.
3. Исследование взаимодействия факторов NER с ДНК-субстратами и интермедиатами процесса методами задержки в геле и флуоресцентного титрования.
4. Определение локализации факторов NER на поврежденной ДНК методами фотоаффинной модификации и нуклеазного футпринтинга.
5. Исследование взаимодействия факторов NER с PARP1 и полимером ADP-рибозы, анализ PAR-илирования факторов NER и его влияния на взаимодействие белков с ДНК-интермедиатами процесса.
6. Исследование репарации AP-сайтов в составе кластеров с производными бенз[а]пирена ферментами BER.
7. Анализ влияния структуры объемного повреждения на активность ферментов BER в процессе репарации AP-сайтов в составе кластеров с производными бенз[а]пирена.

Научная новизна

Впервые показано, что фотореакционноспособные аналоги нуклеотидов, 5-{N-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)-транс-3-аминопропенил-1}-2'-дезоксигуанидин-5'-монофосфат (FAP-dUMP) и экзо-N-{2-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)аминоэтил}-2'-дезокситидин-5'-монофосфат (FAP-dCMP), в составе ДНК-плазмид узнаются и удаляются системой NER эукариот. Выявлено, что XPC-RAD23B взаимодействует с участком неповрежденной цепи ДНК, расположенным напротив повреждения.

Впервые показано совпадение мест контакта с поврежденной ДНК белка человека XPC-RAD23B и его дрожжевого ортолога Rad4-Rad23. Данные по локализации белков, полученные методом фотоаффинного футпринтинга, согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа комплекса Rad4 с фрагментом поврежденной ДНК. Установлена положительная корреляция между углами изгиба поврежденных ДНК-структур и константами диссоциации комплексов XPC-RAD23B с этими ДНК.

Установлены места контактов RPA и XPA с поврежденным ДНК-дуплексом, содержащим область неспаренных оснований: впервые напрямую показано, что XPA располагается в месте перехода одноцепочечной ДНК в дуплекс, а основным местом контакта RPA является участок неповрежденной цепи напротив повреждения.

Продемонстрировано поли(ADP-рибозил)ирование обеих субъединиц XPC-RAD23B, катализируемое PARP1, в присутствии поврежденной ДНК, в том числе под действием УФ-облучения. Впервые показано влияние RPA на активность PARP1 в зависимости от структуры ДНК-активатора. Предложен механизм стимулирующего влияния RPA на синтез PAR

Впервые обнаружено влияние конформации объемного аддукта ДНК с производным бенз[*a*]пирена, B[*a*]P- N^2 -dG, на позиционирование AP-сайта в активном центре AP-эндонуклеазы I и, как следствие, на эффективность его гидролиза, зависящее от взаимного положения повреждений.

Установлена способность ДНК-полимераз β , λ и ι катализировать реакцию заполнения бреши напротив B[*a*]P- N^2 -dG. Впервые показана селективность ДНК-полимеразы λ в отношении изомеров этого аддукта.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данной работы способствуют более глубокому пониманию процессов репарации ДНК и механизмов их регуляции в клетках млекопитающих, в том числе человека. Регуляция активности процессов репарации особенно необходима при исправлении множественных (кластерных) повреждений ДНК для предотвращения образования двухцепочечных разрывов ДНК, возникновения мутаций и генетической нестабильности. Понимание механизмов регуляции процессов репарации ДНК может быть полезно для направленной дисрегуляции этих

процессов в раковых клетках с целью усиления действия ДНК-повреждающих агентов. Полученные результаты могут быть использованы для решения практических задач по поиску мишеней для лекарственных средств, направленных на преодоление как нарушений системы NER, так и на снижение активности этого процесса репарации в раковых клетках.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фотореакционноспособные аналоги нуклеотидов 5-{N-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропионил)-транс-3-аминопропенил-1}-2'-дезоксинуридин-5'-монофосфат (FAP-dUMP) и экзо-N-{2-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропионил)аминоэтил}-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат (FAP-dCMP), введенные в ДНК-плазмиды, узнаются и удаляются системой NER эукариот.
2. Факторы NER, первыми узнающие поврежденную ДНК, взаимодействуют преимущественно с неповрежденной цепью. Обнаруженные закономерности расположения белка на поврежденной ДНК сохраняются при переходе от дрожжей к высшим эукариотам.
3. Белки XPA и RPA специфически взаимодействуют с ДНК-интермедиатом стадии предрасщепляющего комплекса, связываясь с определенными элементами этой структуры.
4. Комплекс XPA-RPA может быть вовлечен не только в предрасщепляющий комплекс, но и в последующие стадии NER.
5. Поли(ADP-рибозил)ирование факторов NER, катализируемое PARP1, регулирует их взаимодействие с ДНК. В свою очередь белки NER влияют на активность PARP1 в зависимости от структуры ДНК.
6. Активность ферментов BER в репарации AP-сайтов в составе кластеров с B[a]P-N²-dG зависит от взаимного расположения повреждений и конформации объемного аддукта.
7. ДНК-полимераза λ проявляет абсолютную специфичность при заполнении брешы напротив *cis*-изомера B[a]P-N²-dG, тогда как ДНК-полимеразы β и ι способны преодолевать оба изомера с меньшей точностью.

Апробация работы

Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на IV и V съездах Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 и Дагомыс-Сочи, 2016); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015); международных конференциях «Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease» (Нидерланды, Нордвейкерхаут, 2006, Эгмонд-ан-Зее, 2011 и 2016); 32- и 38-ом Конгрессах Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Вена, Австрия, 2007 и Санкт-Петербург,

2013); Российско-Европейском семинаре «DNA repair and epigenetic regulation of genome stability» (Санкт-Петербург, 2008); Российско-Швейцарском семинаре «Regulation of genome stability by DNA replication and repair» (Санкт-Петербург, 2010); ежегодных конференциях европейского общества экологического мутагенеза и геномики (EEMGS) (Флоренция, Италия, 2009; Прага, Чехия, 2015; Потсдам, Германия, 2018); международной конференции «Химическая биология 2005» (Новосибирск, 2005); международных конференциях «Физико-химическая биология», посвященных 80-, 85- и 90-летию Академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2006, 2011 и 2016); международной конференции «DNA Polymerases: Biology, Diseases and Biomedical Applications» (Кембридж, Великобритания, 2014); ежегодных конференциях международного консорциума GDRI «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies» (Париж, Франция, 2013 и Рига, Латвия, 2014); международной конференции «25th Wilhelm Bernard Workshop on the cell nucleus» (Нижний Новгород, 2017); VII конгрессе ВОГиС (Санкт-Петербург, 2019); международных конференциях «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB)» (Новосибирск, 2018, 2020).

Публикации.

По материалам диссертации опубликованы 33 печатные работы, в том числе в журналах, индексируемых в базе данных WoS Core Collection – 32, материалов российских и международных конференций – 26.

Личный вклад автора.

Представленные в работе данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве, в том числе в рамках диссертационных работ и проектов, выполненных под его руководством. Автору принадлежит ключевая роль в планировании выполненных исследований, обработке полученных данных и их публикации. Использованные в работе модифицированные олигонуклеотиды были синтезированы на коммерческой основе либо в рамках совместной работы при участии автора.

Моделирование по методу симуляции молекулярной динамики проведено к.х.н. Ковалем В.В., к.ф.-м.н. Ломзовым А.А. и м.н.с. Ждановой П.В.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Фотореакционноспособные арилазидозамещенные аналоги нуклеотидов имитируют повреждения, удаляемые системой NER

Система NER обладает уникальным свойством – способностью удалять широкий спектр структурно различающихся повреждений ДНК. В связи с этим мы предположили, что фотореакционноспособные аналоги нуклеотидов, несущие объемные арилазидо группы, могут узнаваться и процессироваться этой системой. Для подтверждения этого предположения ДНК, содержащие замещенные по основанию остатки dUMP и dCMP, FAP-dUMP (рис. 1 а) и FAP-dCMP (рис. 1 б), анализировали в качестве субстратов NER в экстрактах клеток HeLa.

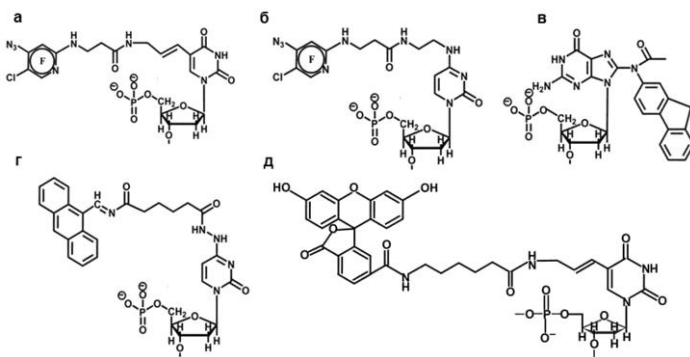


Рис. 1. Структуры аналогов нуклеотидов, несущих объемные заместители, присоединенные к основанию: (а) 5-[N-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)-транс-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксигуанидин-5'-монофосфат (FAP-dUMP), (б) *экзо*-N-{2-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)аминоэтил}-2'-дезоксидезоксицитидин-5'-монофосфат (FAP-dCMP), (в) 8-(N-ацетиламинофлюорен)-2'-дезоксигуанидин-5'-монофосфат (AAF-dGMP), (г) *экзо*-N-(4-(9-антраценилгидразинкарбонил)-бутил-карбамоил)-2'-дезоксидезоксицитидин-5'-монофосфат (Ant-dCMP), (д) 5-[3-[6-(карбоксамидофлуоресценил)амидокапромоил]аллил]-2'-дезоксигуанидин-5'-монофосфат (Flu-dUMP)

В процессе NER происходит вырезание фрагмента ДНК длиной 24-32 н.о., содержащего поврежденный нуклеотид, при этом для эффективного удаления повреждения необходима ДНК длиной около 100 н.о. (Huang & Sancar, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 19034). В качестве субстратов системы NER мы использовали кольцевые двухцепочечные ДНК (плазмиды), в которые вводили анализируемые аналоги нуклеотидов. На первом этапе были получены 60-звенные олигонуклеотиды, комплементарные (+)-цепи плазмиды pBluescript II KS, которые содержали фотоактивируемые аналоги нуклеотидов – FAP-dUMP и FAP-dCMP. Модифицированные нуклеотиды вводили в 3'-конец однонуклеотидной бреши в составе ДНК-дуплекса, используя FAP-dUTP или FAP-dCTP в качестве субстратов ДНК-полимеразы β (Pol β). Образовавшийся одноцепочечный разрыв (ник) лигировали с помощью ДНК-лигазы T4. Реакционную смесь разделяли электрофорезом в денатурирующем ПААГ и выделяли 60-звенный

продукт, который использовали для получения модифицированной плазмиды (рис. 2).

Предварительно фосфорилированный по 5'-концу модифицированный олигонуклеотид гибридизовали с одноцепочечной кольцевой плазмидой pBluescript II KS (+) и использовали в качестве праймера в реакции синтеза комплементарной цепи ДНК-полимеразой фага Т4. После лигирования с помощью ДНК-лигазы фага Т4 двухцепочечную кольцевую ДНК выделяли центрифугированием в градиенте плотности CsCl в присутствии бромистого этидия (EtBr) с последующим удалением EtBr экстракцией бутанолом, концентрированием и обессоливанием с помощью Centricon YM-30. Полученный препарат ДНК дополнительно очищали от остатков исходного 60-звенного олигонуклеотида электрофорезом в агарозном геле.

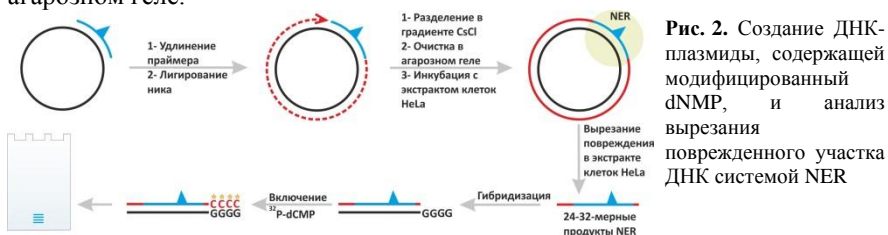


Рис. 2. Создание ДНК-плазмиды, содержащей модифицированный dNMP, и анализ вырезания поврежденного участка ДНК системой NER

Анализ полученных ДНК, содержащих модифицированные нуклеотиды, в качестве субстратов системы NER, проводили в клеточном экстракте HeLa. Эффективность репарации оценивали по количеству образующегося в результате двойного расщепления поврежденной цепи фрагмента ДНК, определяемому методом 3'-концевого радиоактивного мечения. Для этого после остановки процесса репарации нагреванием в реакционную смесь добавляли олигонуклеотид, комплементарный вырезаемому фрагменту и содержащий на 3'-конце фосфатную группу для предотвращения возможности его удлинения в реакции синтеза ДНК, а также несколько остатков dGMP на 5'-конце. Введенный олигонуклеотид использовался в качестве матрицы в реакции синтеза ДНК, катализируемой ДНК-секвеназой (модифицированная ДНК-полимераза фага Т7) в присутствии dGTP, dATP, dTTP и [α - 32 P]-dCTP. Продукты реакции анализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ с последующей радиоавтографией.

Субстратные свойства FAP-dUMP и FAP-dCMP в реакции NER анализировали как в составе полностью комплементарных дуплексов (pU^{FAP} и pC^{FAP}), так и в составе коротких (3 н.о.) участков неспаренных нуклеотидов ($pmmU^{FAP}$ и $pmmC^{FAP}$) (рис. 3). Эффективность удаления исследуемых аддуктов сравнивали с повреждением, эффективно исправляемым системой NER – производным dGMP, несущим остаток ацетиламинофлуорена, AAF-dG (рис. 1 в) (pG^{AAF}) (Heflich & Neft, *Mutat. Res.*, 1994, 318, 173; Scharer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, 42, 2946).

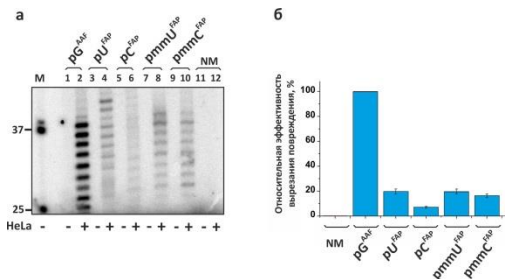


Рис. 3. Анализ процессинга модифицированных двухцепочечных плазмид в экстракте клеток HeLa: (а) продукты реакции вырезания системой NER модифицированных участков ДНК; (б) относительные эффективности системы NER в отношении модифицированных плазмид.

В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду со встроенным олигонуклеотидом без модификации (NM).

Проведенный анализ показал, что ДНК, содержащие остатки FAP-dUMP и FAP-dCMP, подвергаются процессингу системой NER в экстрактах клеток HeLa с образованием характерных продуктов реакции двойного расщепления цепи ДНК вокруг повреждения (рис. 3 а). Видно, что оба исследуемых аналога удаляются с меньшей эффективностью, чем контрольное повреждение AAF-dGMP, при этом FAP-dUMP удаляется более эффективно, чем FAP-dCMP. Эффективность удаления FAP-dCMP в 2,5 раза выше в структуре ДНК с неспаренными основаниями, чем в полном дуплексе, тогда как эффективность репарации FAP-dUMP практически не зависит от наличия неспаренных нуклеотидов (рис. 3 б).

Таким образом, фотореакционноспособные производные нуклеотидов, введенные в ДНК, узнаются и удаляются комплексом NER, и, следовательно, ДНК, содержащие такие группы, могут быть использованы для изучения структуры и механизма функционирования системы NER зукариот.

2. Взаимодействие белка XPC-RAD23B с ДНК, содержащими фотоактивируемые аналоги нуклеотидов

Поскольку наиболее вероятным фактором, осуществляющим первичное узнавание повреждения в процессе NER, считался гетеродимер XPC-RAD23B (125 и 58 кДа соответственно) (*Sugasawa et al. Genes Dev., 2001, 15, 507; Batty et al. J. Mol. Biol., 2000, 300, 275*), представляло интерес выяснить, существует ли корреляция между эффективностью репарации поврежденной ДНК и ее сродством к XPC-RAD23B. В работе использовали рекомбинантный белок. Субъединицу XPC экспрессировали в клетках насекомых, трансфицированных рекомбинантным бакуловирусом. Белок RAD23B, экспрессированный в *Escherichia coli*, выделяли и добавляли к препарату XPC в процессе очистки.

2.1. Взаимодействие белка XPC-RAD23B с модельными ДНК, содержащими FAP-dCMP и FAP-dUMP

Чтобы исключить влияние нуклеотидной последовательности при сравнении эффективностей узнавания повреждения и его удаления, для получения 60-звенных ДНК-дуплексов использовали те же олигонуклеотиды, что и для получения производных плазмиды pBlueScript 9

II KS. Модифицированные олигонуклеотиды гибридизовали с полностью комплементарными олигонуклеотидами ($60dsC^{FAP}$, $60dsU^{FAP}$), либо частично некомплементарными. В этом случае фотоактивируемые группы в ДНК-дуплексе находились в некомплементарных участках длиной три нуклеотида ($60mmC^{FAP}$, $60mmU^{FAP}$) (табл. 1).

Заметные УФ-индуцированные (312 нм) пришивки всех исследованных структур ДНК происходили только к большой субъединице гетеродимера, ХРС (рис. 4), что было подтверждено с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против этого полипептида.

Таблица 1. Последовательности использованных в работе 60-звенных ДНК

Обозначение	ДНК-структура (5' - 3')
$60ssC^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT
$60dsC^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTA
$60dsC$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTA
$60mmC^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATA TCG TTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTAT TCG AACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTA
$60ssU^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT
$60dsU^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTA
$60mmU^{FAP}$	*CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATA TUG TTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGAT GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTAT TCG AACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTA

Здесь, **C** – FAP-dCMP, **U** – FAP-dUMP, * – ^{32}P -метка, неспаренные нуклеотиды выделены рамкой.

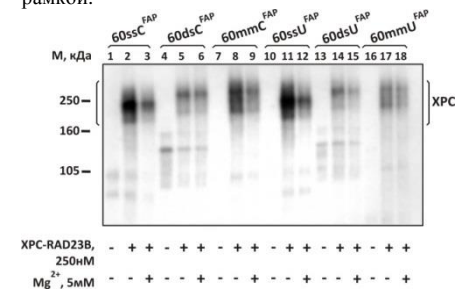


Рис. 4. Фотоаффинная модификация ХРС-RAD23B 60-звенными ДНК-структурами.

Уровень пришивки $60mmC^{FAP}$ был выше, чем $60dsC^{FAP}$, тогда как в случае ДНК, содержащих FAP-dUMP, эффективность модификации ХРС практически не зависела от наличия неспаренных нуклеотидов.

Чтобы определить, в какой степени эффективность фотоаффинного мечения отражает родство белка к ДНК, мы исследовали взаимодействие ХРС-RAD23B с ДНК методом задержки в геле. Полученные данные демонстрируют более прочное связывание ХРС-RAD23B с ДНК, содержащей неспаренные нуклеотиды, в сравнении с полным дуплексом. Введение в структуру ДНК-дуплекса фотоактивируемого производного нуклеотида практически не влияет на эффективность взаимодействия ХРС-RAD23B с ДНК. В присутствии Mg^{2+} , стабилизирующего дуплексную структуру ДНК, наблюдалось существенное снижение уровня образования

Эффективность мечения ХРС зависела как от структуры ДНК и аналога, так и от присутствия в реакционной смеси ионов Mg^{2+} (рис. 4). Наиболее эффективные пришивки наблюдались в случае оцДНК ($60ssC^{FAP}$, $60ssU^{FAP}$).

Уровень пришивки $60mmC^{FAP}$ был выше, чем $60dsC^{FAP}$, тогда как в случае ДНК, содержащих FAP-dUMP, эффективность модификации ХРС практически не зависела от наличия неспаренных нуклеотидов.

комплексов XPC-RAD23B с ДНК. Этот факт подтверждает предположение о том, что ключевое значение в связывании XPC-RAD23B имеет вызванная повреждением дестабилизация двойной спирали ДНК, а не наличие самого повреждения (*Sugasawa et al, Genes Dev., 2001, 15, 507*).

Эффективность фотоаффинной модификации белков реакционноспособными ДНК-структурами зависит не только от прочности образующегося ДНК-белкового комплекса, но и от конформаций белка и ДНК, влияющих на взаимную ориентацию фотореакционноспособной группы ДНК и белковых акцепторов. Этим объясняется тот факт, что модификация XPC-RAD23B зависит не только от структуры ДНК, но и типа фотореакционноспособной группы. В целом, данные по фотоаффинной модификации XPC-RAD23B хорошо согласуются с результатами по выщеплению модифицированных нуклеотидов системой NER в клеточных экстрактах HeLa: в случае FAP-dCMP эффективность модификации возрастает при наличии в ДНК нескольких неспаренных нуклеотидов, в то время как для FAP-dUMP-содержащей ДНК уровень модификации практически не зависит от наличия неспаренных нуклеотидов.

2.2. Объемный заместитель в противоположной цепи дуплекса препятствует образованию ковалентных сшивок XPC-RAD23B с FAP-dCMP

Наряду с ДНК, содержащими объемные фотореакционноспособные группы, были сконструированы и получены ДНК, содержащие нуклеотид с объемным заместителем без фотореакционной функции – производное антрацена (Ant-dCMP, рис. 1 г). 48-Звенный олигонуклеотид, содержащий внутри цепи Ant-dCMP получали, используя соответствующее производное dCTP в качестве субстрата Pol β для заполнения однунуклеотидной брешы с последующим лигированием образовавшегося ника. Олигонуклеотиды, содержащие антрацен-замещенный нуклеотид, гибридизовали с комплементарными олигонуклеотидами, несущими в противоположной цепи немодифицированный нуклеотид (48dsC^{FAP}) либо FAP-dCMP (48dsC^{FAP}/C^{Ant}) (табл. 2). В последнем случае объемные заместители расположены в обеих цепях ДНК-дуплекса. Взаимодействие XPC-RAD23B с полученными 48-звенными фотоактивируемыми одно- (48dsC^{FAP}) и двухцепочечными ДНК (48dsC^{FAP}, 48dsC^{FAP}/C^{Ant}) анализировали методами задержки в геле и фотоаффинной модификации.

Таблица 2. Последовательности использованных в работе 48-звенных ДНК-структур.

Обозначение	ДНК-структура (5'-3')
48ssC ^{FAP}	*СТАТGGCGAGGCGАТТАAGТТGGG C ААСGTCAGGGGCTТССGAAСGAC
48dsC ^{FAP}	*СТАТGGCGAGGCGАТТАAGТТGGG C ААСGTCAGGGGCTТССGAAСGAC GATACCGCTCCGCTAАТТCAACCCGТТGCAGTCCCAGAAAGGCTТGCTG
48dsC ^{FAP} /C ^{Ant}	*СТАТGGCGAGGCGАТТАAGТТGGG C ААСGTCAGGGGCTТССGAAСGAC GATACCGCTCCGCTAАТТCAACCC G ТТGCAGTCCCAGAAAGGCTТGCTG

Здесь, **C** – FAP-dCMP, **G** – Ant-dCMP, * – ³²P-метка.

Во всех экспериментах модификации подвергалась только большая субъединица гетеродимера, эффективность модификации уменьшалась в

присутствии Mg^{2+} (рис. 5). Уровень модификации ХРС резко снижался при наличии в ДНК-дуплексе производного антрацена напротив FAP-dCMP (рис. 5, 8, 9). Эффективности связывания ХРС-RAD23В с обоими ДНК-

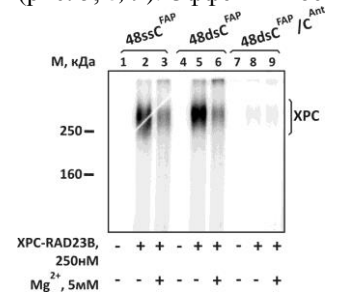


Рис. 5. Фотоаффинная модификация ХРС-RAD23В 48-звеньными ДНК-структурами.

дуплексами, определенные методом задержки в геле, практически не отличались. Таким образом, разница в эффективности модификации отражает скорее не отличие в сродстве ХРС-RAD23В к ДНК, а изменение в топографии ДНК-белкового комплекса.

Параллельно с нашими исследованиями были опубликованы данные, демонстрирующие значительное ингибирование репарации ДНК системой NER при введении повреждений в обе цепи ДНК-дуплекса (*Buterin et al, Chem. Biol., 2005, 12, 913*). Этот факт и полученные нами данные по значительному ингибированию модификации ХРС ДНК-дуплексом с объемными заместителями в обеих цепях позволяют предположить, что для формирования требуемой для дальнейшего развития процесса репарации топографии комплекса необходимо взаимодействие ХРС-RAD23В с участком неповрежденной цепи ДНК напротив повреждения.

3. Определение топографии комплекса ХРС-RAD23В с поврежденной ДНК

Для более точной локализации ХРС-RAD23В на поврежденной ДНК мы провели фотаффинное мечение белка набором ДНК-дуплексов, содержащих фотоактивируемую группу «нулевой длины» в определенном положении цепи («фотоаффинный футпринтинг»).

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности фотоактивируемых 48-звенных ДНК-дуплексов.

Обозначение	ДНК-структура (5' - 3')
<u>1 - 6</u> F _γ или F _α	<p style="text-align: center;"> -11 -6 -1 0 +4 +10 ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ </p> <p> C T A T G G C G A G G G C A T T A A G T T G G G C A A C G T C A G G G T C T T C C G A A C G A C G A T A C C G T C C C G T A A T T C A A C C C C G F T G C A G T C C C A G A A G G C T T G C T G </p>
<u>N</u> F _{T11} - F _{T14}	<p> C T A T G G C G A G G G C A T T A A G T T G G G T A A C G T C A G G G T C T T C C G A A C G A C G A T A C C G T C C C G T A A T T C A A C C C A T F G C A G T C C C A G A A G G C T T G C T G </p> <p style="text-align: center;"> ▲ ▲ ▲ ▲ -13 -9 -1 +5 </p>

Здесь, F – Flu-dUMP, стрелками и номерами указаны позиции 5I-dUMP.

В качестве фотоаффинных реагентов использовали 48-звенные ДНК-дуплексы, содержащие флуоресцеин-замещенное производное dUMP (Flu-dUMP, рис. 1 д) в качестве повреждения и фотореакционноспособный остаток 5I-dUMP (5-йодо-2'-дезоксинуридин-5'-монофосфат) в определенных позициях поврежденной и неповрежденной цепей ДНК-дуплекса (табл. 3).

3.1. XPC-RAD23B контактирует преимущественно с неповрежденной цепью ДНК-дуплекса

Результаты электрофоретического анализа продуктов модификации (рис. 6 а) демонстрируют сшивки большой субъединицы XPC-RAD23B с обеими цепями ДНК-дуплексов. Эффективность сшивок зависит от концентрации белка и положения фотоактивируемого аналога (гистограмма рис. 6 б). В комплексе, соответствующем связыванию одной молекулы белка с молекулой ДНК (рис. 6 в), максимальный уровень продуктов

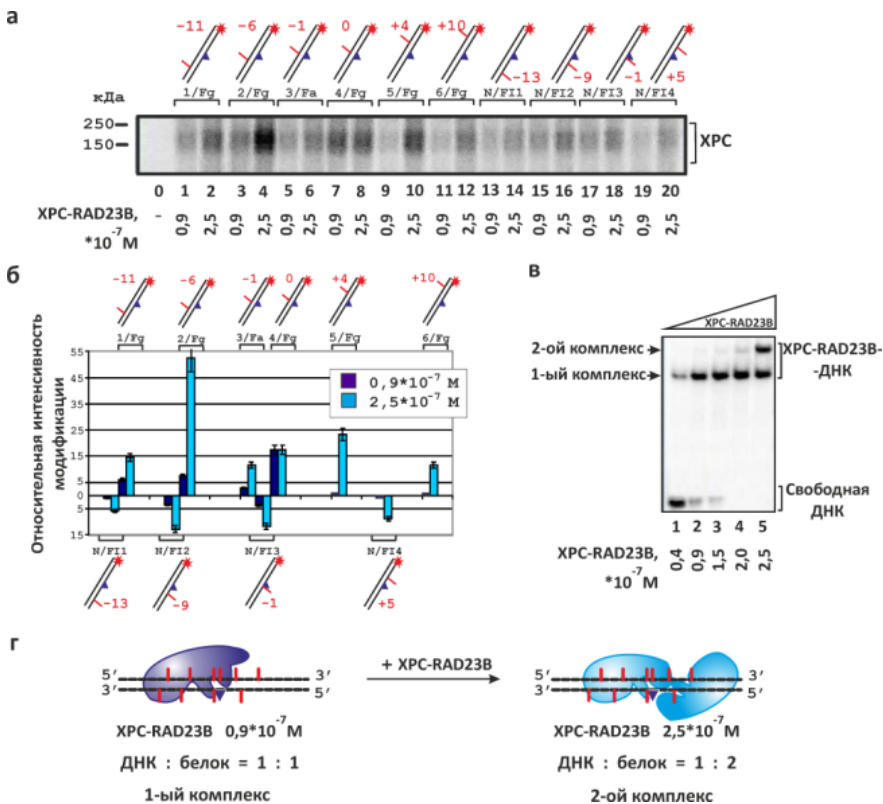


Рис. 6. Модификация XPC-RAD23B фотореакционноспособными ДНК-дуплексами. (а) Анализ продуктов модификации в SDS-ПААГ. Сверху схематично представлены ДНК-структуры, здесь и далее черточками обозначены позиции 5I-dUMP, числа указывают положение фотоактивируемой группы относительно остатка Flu-dUMP (треугольник). (б) Относительные уровни модификации, определенные путем усреднения результатов трех экспериментов. Верхняя часть гистограммы – пришивки к неповрежденной цепи ДНК, нижняя – к поврежденной. (в) Анализ связывания XPC-RAD23B с поврежденным ДНК-дуплексом методом задержки в геле. (г) Схема расположения XPC-RAD23B на поврежденной ДНК.

модификации наблюдается для структуры 4/Fg, в которой остаток 5I-dUMP находится в положении «0» неповрежденной цепи, т.е. непосредственно напротив повреждения (рис. 6 а, 7). ДНК-структуры, в которых фотоаналог

располагался в «+»-направлении от повреждения (позиции «+4» и «+10» в неповрежденной цепи и «+5» – в поврежденной), модифицировали белок при этой концентрации с заметно меньшей эффективностью, чем ДНК, содержащие 5I-dUMP в «-»-позициях.

Уровень пришивки к реагенту в «0»-позиции не изменяется после связывания с ДНК второй молекулы XPC-RAD23B (рис. 6 в) (рис. 6 а, 7, 8), что свидетельствует в пользу специфичности контакта белка с этим нуклеотидом и подтверждает гипотезу о его важности для взаимодействия с поврежденной ДНК.

Зависимость интенсивности пришивок XPC-RAD23B от положения 5I-dUMP в ДНК (рис. 6 б) указывает на более тесные контакты белка с неповрежденной цепью дуплекса с 5'-стороны от повреждения (рис. 6 з). Появление дополнительных пиков модификации при увеличении концентрации XPC-RAD23B (рис. 6 а, 10, 12 и 20) отражает, вероятнее всего, неспецифическое связывание второй молекулы белка с неповрежденным участком ДНК-дуплекса (рис. 6 б и г).

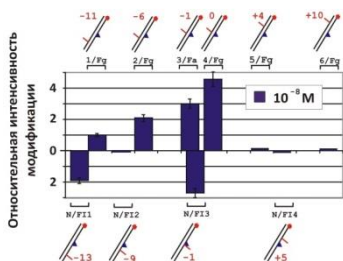
Полученные данные по локализации XPC-RAD23B на поврежденной ДНК согласуются с предположением о том, что XPC-RAD23B узнает не само повреждение, а участок неспаренных оснований в ДНК, возникающий вследствие дестабилизации дуплекса, вызванной повреждением, и взаимодействует с неповрежденной цепью (*Buterin et al. Chem. Biol., 2005, 12, 913; Maillard et al. PLoS Biol., 2007, 5, e79*). Подтверждение этого предположения было получено с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) комплекса Rad4, дрожжевого ортолога XPC, с фрагментом поврежденной ДНК (*Min & Pavletich, Nature, 2007 449, 570*).

3.2. Локализация Rad4-Rad23 по данным «фотоаффинного футпринтинга» совпадает с результатами РСА

Чтобы установить, насколько структурные данные, полученные методом РСА для дрожжевого белка, применимы для XPC-RAD23B человека, структура которого до сих пор не решена, мы провели модификацию Rad4-Rad23 (препарат белка, полностью идентичный использованному для кристаллизации, был предоставлен Ю.-Х. Мин, (University of Illinois at Chicago) тем же набором фотоактивных ДНК. Максимальный уровень модификации Rad4, как и в случае XPC, наблюдается для ДНК, в которой 5I-dUMP расположен прямо напротив повреждения (рис. 7). На основании кристаллической структуры, в комплексе с Rad4 нуклеотид напротив повреждения связывается в гидрофобном кармане белка, образованном аминокислотными остатками домена BHD3 (*Min & Pavletich, Nature, 2007, 449, 570*). Можно предположить, что тесное взаимодействие этого нуклеотида с белком обеспечивает максимальный уровень ДНК-белковых сшивков. При соотношении белок:ДНК=1:1 относительно высокие уровни модификации Rad4-Rad23, соответствующие позициям 5I-dUMP с 5'-стороны от повреждения (рис. 7), могут быть результатом контактов тандема TGD-BHD1 с неповрежденным участком дцДНК (*Min & Pavletich, Nature, 2007,*

449, 570). Таким образом, максимумы интенсивности модификации Rad4-Rad23 совпадают с местами контакта этого белка с ДНК по данным РСА.

а



б

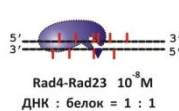


Рис. 7. Модификация Rad4-Rad23 фотореакционноспособным и ДНК-дуплексами (а) Относительные уровни модификации, определенные усреднением результатов трех экспериментов. (б) Схема расположения Rad4-Rad23 на поврежденной ДНК.

На основании структуры Rad4 и результатов фотоаффинной модификации дрожжевого и человеческого ортологов можно говорить о совпадении характера взаимодействий этих белков с ДНК и, следовательно, о применимости предлагаемой модели расположения XPC-RAD23B на поврежденной ДНК.

Одинаковая локализация белков XPC-RAD23B и Rad4-Rad23 на поврежденной ДНК свидетельствует в пользу консервативности в разных видах структурной организации факторов, «сканирующих» ДНК на наличие повреждения. Можно предположить, что позиционирование этих факторов с 5'-стороны на неповрежденной цепи задает последующую асимметрию предрасщепляющего комплекса, формирующегося на ДНК перед выщеплением поврежденного фрагмента.

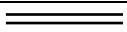

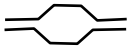


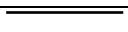
3.3. Сродство XPC/Rad4 к ДНК прямо коррелирует со степенью дестабилизации дуплекса

Поскольку XPC/Rad4 определяет наличие в ДНК дестабилизированных участков дуплекса, возникающих вследствие повреждения, мы исследовали влияние нарушений структуры дуплекса, таких как объемное повреждение и/или область неспаренных оснований – «пузырь» на связывание XPC/Rad4 с ДНК. Анализ связывания XPC-RAD23B и Rad4-Rad23 с ДНК методом задержки в геле показал общие закономерности в эффективности связывания различных структур ДНК: сродство обоих белков увеличивается в ряду: неповрежденная ДНК < поврежденная ДНК < ДНК, содержащая «пузырь» < ДНК, содержащая «пузырь» и повреждение.

Константы диссоциации ДНК-белковых комплексов определяли методом флуоресцентного титрования с измерением анизотропии флуоресценции. Остаток Flu-dUMP, моделирующий объемное повреждение, также выступал в качестве репортерной группы. Константы диссоциации комплексов с ДНК, не содержащими флуоресцентной группы, определяли из экспериментов по конкурентному титрованию. Анализ данных проводили в рамках модели, предполагающей эквимоллярное связывание белка с ДНК.

Чтобы выяснить, насколько средство белка отражает изменение структуры дуплекса, индуцированное повреждением, мы сопоставили константы диссоциации комплексов ДНК–ХРС/Rad4 со степенью нарушения геометрии двойной спирали ДНК, которую определяли по углу изгиба ДНК-дуплексов.

Таблица 4. Углы изгиба ДНК и средство ХРС/Rad4 к ДНК-структурам

Тип ДНК	Угол изгиба (α)	ХРС-RAD23В К _D , нМ	Rad4-Rad23 К _D , нМ
	0°	5 ± 2	2,5 ± 1,6
	(40±3)°	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3
	(56±3)°	0,25 ± 0,06	0,3 ± 0,1
	(64±2)°	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,04
	-	30 ± 20	14 ± 2 n = 4
	-	70 ± 50	20 ± 10

Остаток Flu-dUMP обозначен треугольником; n – число сайтов связывания.

В ряде работ (*Thompson & Landy, Nucleic Acids Res., 1988, 16, 9687; Виноградова и др., Биоорг. хим., 2009, 35, 384*) было показано, что электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса в нативном ПААГ пропорциональна расстоянию между концами этого дуплекса (его контурной длине). На основании электрофоретической подвижности с использованием предложенной формулы (*Thompson, Landy, 1988*) были рассчитаны углы изгиба ДНК: $\alpha = 2 \cdot \arccos (M/N)$, где M – электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса, содержащего повреждение в центральной позиции; N – электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса, содержащего повреждение на одном из концов (вводится для исключения эффекта увеличения массы за счёт повреждения). Результаты расчетов, а также константы диссоциации комплексов представлены в таблице 4.

Полученные данные показывают, что средство ХРС/Rad4 напрямую зависит от степени изгиба ДНК, которая, в свою очередь, коррелирует с нарушением дуплексной структуры ДНК.

4. Белки ХРА и RPA – ключевые элементы комплекса NER

В начале исследования системы NER в качестве факторов, узнающих повреждение, наряду с ХРС-RAD23В рассматривались и другие неотъемлемые компоненты этой системы – белки ХРА и RPA (*He Z. et al. Nature, 1995, 374, 566; Koberle et al. DNA Repair, 2006, 5, 641*). И хотя позднее в результате многочисленных исследований было установлено, что сенсором повреждений в системе NER является ХРС-RAD23В, участие ХРА и RPA в узнавании повреждения и последующих этапах процесса до сих пор интенсивно исследуется. Известно, что ХР-А-пациенты страдают одной

из наиболее тяжелых форм пигментной ксеродермы, а инактивация XPA приводит к практически полному ингибированию процесса NER (Clever & Kraemer, In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 1997). Противоречивые мнения также существуют по поводу роли RPA. Известно, что этот белок имеет повышенное сродство к поврежденной ДНК (He Z. et al. *Nature*, 1995; Burns et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 11607) и в реконструированной из очищенных белков системе NER образует вместе с XPA, XPC-RAD23B и TFIIH комплекс на поврежденной ДНК в отсутствие эндонуклеаз XPG и ERCC1-XPF (Mu D. et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 2415), т. е. RPA участвует в процессе не только на стадии ресинтеза ДНК, но и на более ранних этапах. Таким образом, оба белка, XPA и RPA, остаются интересными объектами для изучения их роли на различных этапах NER.

После обнаружения места дестабилизации дуплекса происходит проверка этого участка на наличие повреждения и определение поврежденной цепи ДНК (Hess et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 6664). Основную роль на этом этапе играет мультифункциональный 10-субъединичный белок – фактор транскрипции III (TFIIH), который взаимодействует с XPC и осуществляет частичное раскручивание ДНК-дуплекса за счет геликазной активности субъединицы XPD и одновременно детектирует повреждение, останавливаясь на нем (Evans et al, *EMBO J.*, 1997; Mathieu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010). В верификации обнаруженной XPC-RAD23B области дестабилизации ДНК также участвуют XPA и RPA. В экспериментах *in vitro* было показано, что эти белки привлекаются на ДНК-дуплекс с ~15 неспаренными нуклеотидами, моделирующий ДНК-интермедиат этой стадии NER (Tapias et al, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 19074). Предполагается, что дискриминация поврежденной цепи ДНК происходит уже в таком частично раскрытом ДНК-дуплексе. Таким образом, исследование взаимодействия XPA и RPA с ДНК-структурами, имитирующими этот ДНК-интермедиат, необходимо для понимания механизма формирования предрасщепляющего комплекса, обеспечивающего удаление поврежденного участка и сохранение целостности нативной цепи ДНК.

4.1. Взаимодействие XPA и RPA с ДНК-интермедиатами NER на стадии узнавания повреждения и формирования предрасщепляющего комплекса

Для определения того, насколько селективно XPA и RPA способны взаимодействовать с ДНК, содержащей повреждение, относительно такой же, но без повреждения, были проведены эксперименты по связыванию этих белков с модельными ДНК в присутствии избытка конкурентной ДНК (рис. 8). Прежде всего, следует отметить, что как для XPA (рис. 8 а), так и для RPA (рис. 8 б), наибольшая разница в сродстве наблюдается между ДНК-дуплексами и ДНК-структурами, содержащими «пузырь». XPA и RPA связываются с частично открытым ДНК-дуплексом эффективнее на 50 и 60% соответственно, чем с полным дуплексом. Разница в уровне

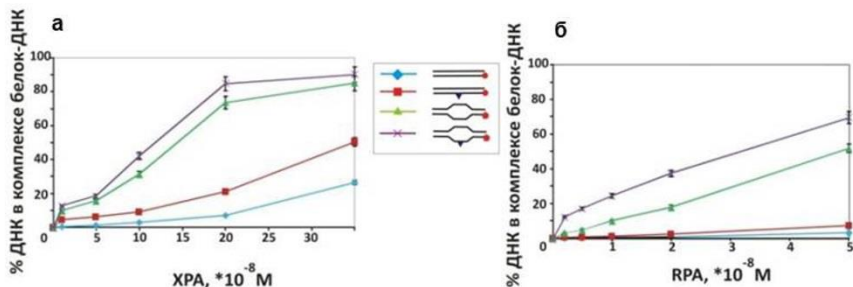


Рис. 8. Связывание XPA (а) и RPA (б) с нативными и поврежденными ДНК-структурами в присутствии пятикратного избытка конкурентной ДНК – неповрежденного немеченого 48-звенного ДНК-дуплекса. Значения на графиках получены усреднением результатов пяти экспериментов.

связывания между поврежденной и неповрежденной структурой в случае XPA более выражена для ДНК-дуплекса, тогда как в случае RPA такая разница наблюдается для ДНК с «пузырем». Таким образом, оба белка проявляют определенную селективность в связывании с поврежденной ДНК в зависимости от исходной структуры ДНК.

Далее мы определили локализацию XPA и RPA на поврежденных ДНК методом фотоаффинной модификации (рис. 10). Использованные ДНК-структуры содержали остаток 5I-dUMP в различных положениях поврежденной или неповрежденной цепей полного (табл. 3) или частично открытого ДНК-дуплекса (табл. 6).

Таблица 5. Последовательности 48-звенных частично открытых ДНК-дуплексов.

Обозначение	ДНК-структура (5'–3')					
		-10	-5	0	+4	+11
<u>1 – 6</u> Fb	СТАТGGCGAGGCGАТТА	▼	AGTTGGGCAACGTCA	▼	GGGTCTTCCGAACGAC	▼
	GATACCGCTCCGСТААТ		AGTTGGG F AACGTCA		CCCAGAAGGCTTGCTG	
<u>В</u> F11 – F14	СТАТGGCGAGGCGАТТА		TCAACCCАТТGCAGT		GGGTCTTCCGAACGAC	
	GATACCGCTCCGСТААТ		TCAACCCАТ F GCAGT		CCCAGAAGGCTTGCTG	
		▲	▲	▲	▲	
		-13	-9	-1	+5	

Здесь, **F** – остаток Flu-dUMP, рамкой выделена область неспаренных нуклеотидов размером 15 н.о. – «пузырь», позиции 5I-dUMP обозначены стрелками и номерами.

Сопоставление уровней пришивки XPA к 5I-dUMP в различных положениях частично открытого ДНК-дуплекса показывает, что максимальные уровни модификации белка соответствуют позициям фотореагента вблизи перехода оц–дц ДНК с 5'-стороны от повреждения (рис. 9 а). Эти данные впервые демонстрируют локализацию XPA на ДНК-структуре, содержащей повреждение в области неспаренных нуклеотидов. Согласно ранее опубликованным данным (*Li L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5012*), XPA взаимодействует с ERCC1 – субъединицей структурно-специфичной эндонуклеазы XPF-ERCC1, которая расщепляет поврежденную цепь с 5'-стороны от повреждения, и взаимодействие этих

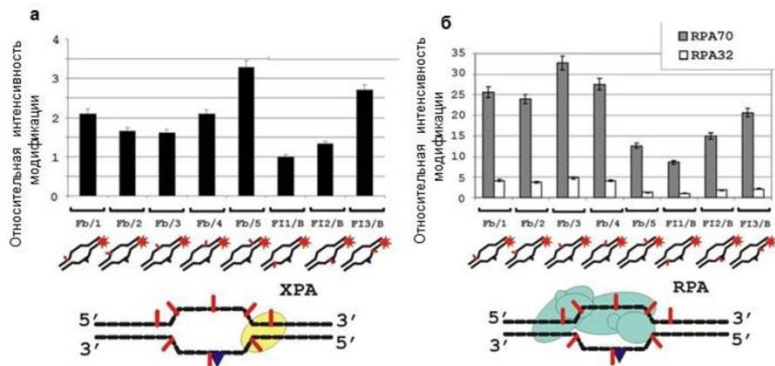


Рис. 9. Модификация XPA и RPA фотореакционноспособными частично открытыми ДНК-дуплексами. Относительные уровни модификации XPA (а) и RPA (б) определены усреднением результатов трех экспериментов. Внизу схематично представлены ДНК-структуры и предполагаемое расположение на них белков.

белков абсолютно необходимо для процесса NER (*Orelli B. et al, J. Biol. Chem., 2010, 285, 3705*). Можно предположить, что показанное расположение XPA обеспечивает привлечение и корректное позиционирование XPF-ERCC1 на ДНК при формировании предрасщепляющего комплекса.

Для RPA наиболее высокий уровень фотопришивок наблюдается к остаткам 5I-dUMP, расположенным в неповрежденной цепи (рис. 9 б), модификации подвергается в основном большая субъединица гетеротримера (RPA70). Согласно данным по связыванию, с частично открытым ДНК-дуплексом в использованном диапазоне концентраций RPA связываются две молекулы белка. На основании этого можно предположить, что в формировании предрасщепляющего комплекса участвуют две молекулы RPA: одна молекула взаимодействует с одноцепочечным участком неповрежденной цепи, а вторая молекула расположена вблизи перехода оц-дц ДНК с 3'-стороны от повреждения. Такое расположение RPA согласуется с литературными данными о полярном связывании этого белка с ДНК, содержащей брешу (*Kolpashchikov et al, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 373*). Предполагается, что полярность связывания RPA обеспечивает условия для точного позиционирования высокоспецифичных нуклеаз XPF и XPG (*De Laat et al, Genes Dev., 1998, 12, 2598*).

Расположение максимумов интенсивности модификации XPA и RPA поврежденным дуплексом сохраняет тенденции, выявленные для ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря»: XPA более эффективно пришивается к ДНК с 5'-стороны от повреждения, RPA контактирует преимущественно с неповрежденной цепью. Следует заметить, что правильное позиционирование XPA и RPA в структуре предрасщепляющего комплекса может осуществляться в отсутствие других участников процесса.

4.2. Взаимодействие RPA и XPA при связывании с ДНК

Как было показано ранее, комплекс RPA–XPA может быть выделен из экстракта клеток HeLa иммунопреципитацией любого из этих белков (*Matsuda et al, J. Biol. Chem., 1995, 270, 4152*) и имеет более высокое сродство к поврежденной ДНК, чем отдельные белки (*He Z. et al, Nature, 1995, 374, 566; Li L. et al, Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1993*). Кроме того, RPA значительно стимулирует связывание XPA с ДНК-дуплексами, несущими повреждение, а делеционные мутанты XPA, не способные взаимодействовать с RPA70, не поддерживают реакцию NER (*Li L. et al, Mol. Cell. Biol., 1995*). Этот комплекс организует ядро предрасщепляющего комплекса за счет белок-белковых взаимодействий со всеми участниками процесса.

Мы провели анализ образования тройного комплекса RPA–XPA–ДНК при связывании RPA и XPA с ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря» (рис. 10). При эквимольном соотношении RPA и ДНК

регистрируются слабые полосы продуктов, которые могут быть отнесены к комплексу RPA–XPA–ДНК (рис. 10, сравнить 12-15 с 3 и 7-11). Однако уже при небольшом избытке RPA наблюдается интенсивная полоса, соответствующая комплексу RPA–XPA–ДНК (рис. 10, сравнить 16-20 с 5 и 7-11). Образование тройных комплексов RPA–XPA–ДНК также наблюдается при связывании белков с ДНК-дуплексами,

Рис. 10. Анализ взаимодействия RPA и XPA при связывании с частично открытым поврежденным ДНК-дуплексом

содержащими выступающие оц участки.

Взаимодействие между RPA и XPA в комплексе с ДНК исследовали также методом фотоаффинной модификации с использованием частично открытого поврежденного ДНК-дуплекса, содержащего остаток 5I-dUMP в определенных положениях поврежденной и неповрежденной цепей (рис. 11).

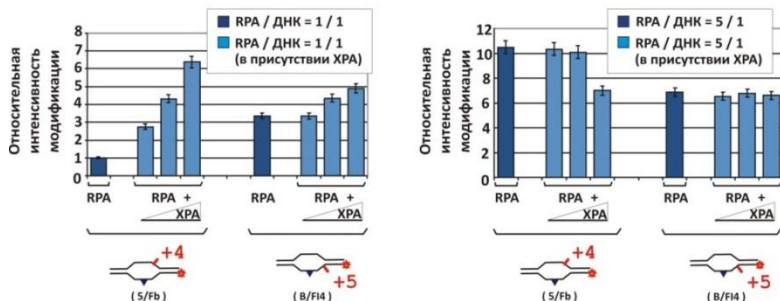


Рис. 11. Взаимодействие RPA и XPA при связывании с частично открытым поврежденным ДНК-дуплексом. Относительные уровни модификации RPA определяли усреднением результатов пяти экспериментов.

Эффективность модификации RPA и XPA зависела как от концентраций белков, так и от их соотношения. В присутствии эквимольного по отношению к ДНК количества RPA эффективность модификации XPA обеими цепями уменьшалась. По мере увеличения концентрации XPA эффективность модификации RPA возрастала (рис. 11, левая панель). В присутствии небольшого избытка RPA наблюдалось снижение уровня модификации XPA, тогда как модификация RPA сохранялась на прежнем уровне (рис. 11, правая панель).

Данные по локализации RPA и XPA на поврежденных ДНК-структурах, полученные методом фотоаффинной модификации, были подтверждены и дополнены с помощью нуклеазного расщепления ДНК в присутствии RPA и/или XPA. Определить локализацию XPA на дуплексной части по защите от расщепления ДНКазой I не удалось – специфической защиты определенных участков не наблюдалось, что согласуется с литературными данными (*Wakasugi & Sancar, J.Biol. Chem., 1999, 274, 18759*). Специфическую защиту дцДНК от нуклеазного расщепления в присутствии RPA, XPA и их комбинации удалось выявить при использовании нуклеазы *Eco*III. Для подтверждения локализации RPA и XPA в области неспаренных нуклеотидов в частично открытом ДНК-дуплексе исследована способность этих белков защищать ДНК от расщепления нуклеазой *Mung Bean*. Показано, что RPA и XPA защищают оц участки ДНК от расщепления эффективнее, чем дуплексную часть, а одновременное присутствие RPA и XPA в реакционной смеси приводит к кооперативной защите ДНК от нуклеазной деградации.

На основании результатов исследований взаимодействия XPA и RPA с частично открытой поврежденной ДНК можно предположить вероятную локализацию и взаимную ориентацию этих белков в составе предрасщепляющего комплекса NER (рис. 13).

Полученные результаты в сочетании с литературными данными позволяют заключить, что XPA и RPA необходимы как для привлечения, так и для правильного позиционирования и координации других факторов NER в составе предрасщепляющего комплекса.

4.3. Роль комплекса XPA-RPA на постинцизионных этапах NER

Таким образом, XPA и RPA являются неотъемлемыми участниками процесса NER на стадиях, предшествующих вырезанию поврежденного фрагмента ДНК. Известно, что RPA вновь участвует в процессе на стадии ресинтеза удаленного участка в составе репликативной машины (*He Z et al,*

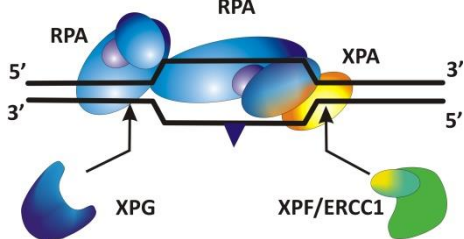


Рис. 12. Локализация XPA и RPA на ДНК в составе предрасщепляющего комплекса NER. Стрелками указаны предполагаемые места посадки структурно специфических нуклеаз NER – XPF-ERCC1 и XPG.

Nature, 1995, 374, 566; Riedl et al, *EMBO J*, 2003, 22, 5293; Chen R et al, *Nucleic Acids Res*, 2016, 44, 5758). Обнаружено также, что в репликативной вилке с фактором репликации PCNA взаимодействует XPA (Gilljam et al, *PLoS One*, 2012, 7, e49199). Мы предположили, что XPA и RPA (или их комплекс) могут находиться на ДНК после ее расщепления инцизионными нуклеазами, и исследовали взаимодействие этих белков с ДНК-интермедиатами поздних (постинцизионных) стадий процесса.

В работе использовали 60-звенные ДНК-дуплексы, содержащие флэп длиной 31 н.о. с остатком Flu-dUMP в качестве объемного повреждения, и брешь длиной 26 или 10 н.о. Структура, содержащая поврежденный флэп и брешь 26 н.о, имитирует ДНК-интермедиат, возникающий в процессе NER после расщепления поврежденной цепи специфической эндонуклеазой XPF-ERCC1; ДНК с флэпом и брешью 10 н.о. можно отнести к интермедиату последующего частичного заполнения брешы (Staresinic et al, *EMBO J*, 2009, 28, 1111).

Методом задержки в геле исследовано связывание RPA и XPA с модельными ДНК (рис. 13). Анализ набора комплексов RPA с ДНК,

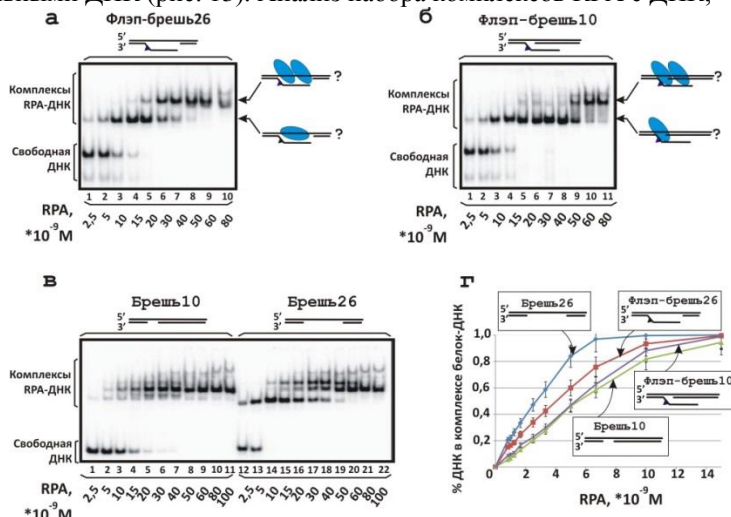


Рис. 13. Связывание RPA с ДНК-структурами, имитирующими интермедиаты постинцизионных стадий NER: ДНК с длинной брешью и флэпом (а), ДНК с короткой брешью и флэпом (б), ДНК с брешью (в). Кривые связывания, построенные по усредненным результатам трех экспериментов, представленных на панелях а-в (г).

содержащей флэп 31 н.о. и брешь 26 н.о. (рис. 13 а), показал его несоответствие теоретически возможному. При увеличении концентрации белка происходило накопление комплекса, соответствующего связыванию двух молекул RPA с ДНК, а комплексы более высокого порядка не наблюдались, хотя число сайтов связывания RPA с двумя оц участками такой длины – 4. В случае ДНК, содержащей флэп и брешь 10 н.о., наблюдалось образование одного основного комплекса даже при избытке

белка (рис. 13 б), что также не согласуется с теоретически возможным числом минимальных сайтов связывания с ДНК – 3 (2 на флэпе и 1 в брешу). Единственный основной комплекс наблюдался и при связывании RPA с ДНК, содержащей только брешь 10 н.о. (рис. 13 в). Кроме того, эффективность связывания RPA с ДНК, содержащей флэп и длинную брешь, была ниже, чем с ДНК, содержащей только брешь того же размера (рис. 13 г). Эти данные позволяют предположить, что основным местом контакта RPA является оцДНК в брешу. Таким образом, можно предположить, что взаимодействие RPA с ДНК-структурами, образующимися после расщепления поврежденной цепи эндонуклеазой XPF-ERCC1, осуществляется за счет связывания с участком неповрежденной ДНК в брешу независимо от ее длины.

Это предположение подтверждено методом фотоаффинной модификации (рис. 14): уровень пришивок RPA к ДНК, содержащей остаток 5I-dUMP в брешу 26 н.о., выше, чем к ДНК-структурам с фотоактивной группой во флэпе (рис. 14 а). В случае ДНК с брешью 10 н.о. наличие флэпа приводило к снижению эффективности сшивок (рис. 14 б).

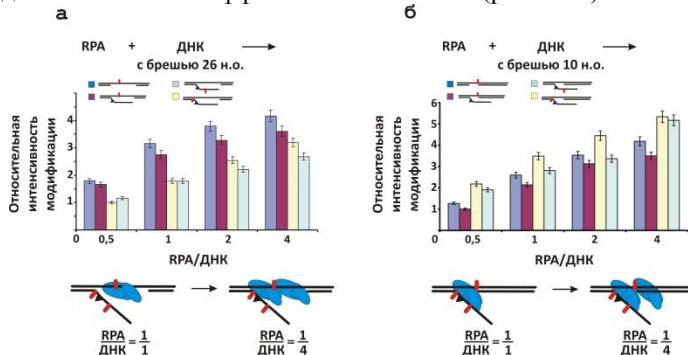


Рис. 14. Относительная эффективность модификации RPA (p70) фотоактивными ДНК с брешью 26 н.о. (а) или 10 н.о. (б) и остатком 5I-dUMP в составе флэпа или брешу при различных соотношениях белок:ДНК. Внизу представлены схемы возможного расположения RPA на ДНК-структурах.

Анализ связывания XPA с исследуемыми ДНК-структурами выявил некоторое предпочтение этого белка к ДНК с короткой брешью и снижение сродства к ДНК, содержащей флэп и брешь одновременно. Кроме того, наибольшее сродство XPA проявляет к структуре с «пузырем», которая является предшественником структуры с флэпом и брешью. Исследование формирования тройного комплекса RPA-XPA-ДНК в зависимости от соотношения концентраций RPA/ДНК и RPA/XPA и типа ДНК показало, что образование тройного комплекса происходит более эффективно на ДНК-дуплексе с 5'-выступающим оц участком, чем на ДНК, содержащей 3'-выступающий оц участок. На основании полученных и литературных данных предложена модель, демонстрирующая локализацию факторов NER на ДНК-интерmediate, формирующемся после расщепления поврежденной

цепи эндонуклеазой XPF-ERCC1 (рис. 15). Таким образом, можно предположить участие XPA на поздних стадиях NER в комплексе с RPA.

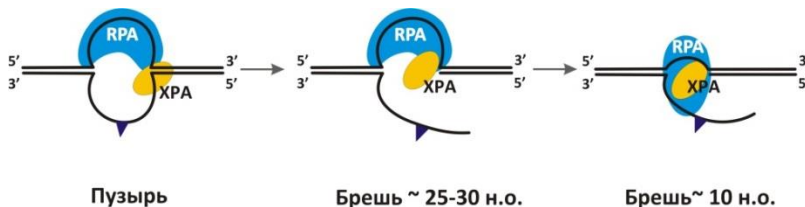


Рис. 15. Предлагаемое расположение RPA и XPA в комплексах с ДНК до и после эксцизии. После разрезания поврежденной цепи ДНК эндонуклеазой XPF-ERCC1 RPA остается связанным с неповрежденной цепью в образовавшейся бреши. В процессе укорочения бреши в результате ресинтеза RPA может перемещаться на флэп.

5. PARP1 модифицирует факторы NER и модулирует их взаимодействие с ДНК

Поли-ADP-рибозилирование белков – один из ключевых механизмов регуляции репарации ДНК. В ответ на повреждение ДНК в клетках высших эукариот происходит модификация ядерных белков с помощью полимера ADP-рибозы (PAR), синтезируемого поли(ADP-рибоза)полимеразми (PARP). Белки PARP образуют суперсемейство, характерной особенностью которого является наличие консервативного домена, содержащего мотив «PARP signature», участвующий в формировании активного центра (*Ame et al, Bioessays, 2004, 26, 882*). В качестве источника ADP-рибозы PARP используют NAD^+ и переносят эту группу на белок-акцептор.

Из трех ферментов PARP, активируемых поврежденной ДНК (PARP1, PARP2 и PARP3), наибольший вклад в синтез поли(ADP-рибозы) в клетке вносит PARP1 – до 90% (*Shieh et al, J. Biol. Chem., 1998, 273, 30069*). Реакция PAR-илирования обратима: PAR подвергается расщеплению с помощью фермента поли(ADP-рибоза)гликогидролазы (PARG), что обеспечивает дополнительную регуляцию уровня PAR-илирования белков и синтеза PAR в клетке.

Одним из ключевых регуляторов репарации ДНК и других клеточных процессов считается PARP1 (*Burkle & Virag, Mol. Aspects Med., 2013, 34, 1046; Liu C et al, Nucleic Acids Res., 2017, 45, 8129*). Участие PARP1 в процессе эксцизионной репарации оснований исследовано достаточно подробно (*Ходырева, Лаврик, Молекуляр. биол., 2016, 50, 655*), тогда как роль PARP1 и синтезируемого этим ферментом PAR в процессе NER долгое время оставалась практически неисследованной, хотя активация PARP1 в ответ на УФ-облучение и вызываемые им повреждения ДНК была показана еще в 1980-е годы (*Berger et al, Biochemistry, 1980, 19, 289; Jacobson et al, J. Biol. Chem., 1983, 258, 103*).

5.1. Влияние синтеза PAR, катализируемого PARP1, на связывание XPC-RAD23B с ДНК

На момент начала работы было известно, что ингибирование синтеза PAR в клетке с помощью ингибиторов PARP1 снижает эффективность

связывания XPC-RAD23В с УФ-поврежденной ДНК (Luijsterburg et al, *J. Cell. Biol.*, 2012, 197, 267; Robu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 1658). Кроме того, XPC обнаружен с помощью протеомных методов в числе белков, подвергающихся PAR-илированию в ответ на генотоксический стресс (Jungmichel et al, *Mol. Cell*, 2013, 52, 272). Однако прямые данные о PAR-илировании XPC-RAD23В, а также о взаимодействии этого белка с PARP1 и PAR в литературе отсутствовали.

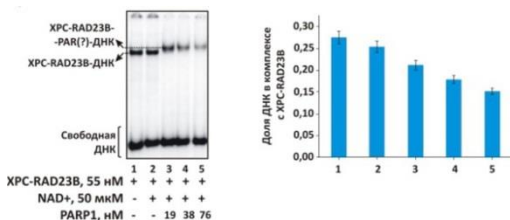


Рис. 16. Влияние PARP1 и синтеза PAR на связывание XPC-RAD23В с ДНК. Электрофоретическая подвижность и количество комплексов XPC-RAD23В–ДНК уменьшаются в присутствии PARP1 и NAD⁺.

На первом этапе мы проверили влияние PARP1 на связывание XPC-RAD23В с 48-мерным ДНК-дуплексом, содержащим Flu-dUMP в качестве повреждения, в отсутствие и в присутствии NAD⁺. Анализ комплексов показал, что в условиях синтеза PAR электрофоретическая подвижность комплексов XPC-RAD23В с ДНК снижалась, что может свидетельствовать о

связывании белка с PAR, как ковалентном, так и нековалентном.

Количество комплекса XPC-RAD23В–ДНК, как и его подвижность, снижалось с увеличением концентрации PARP1 (рис. 16) или NAD⁺, однако полной диссоциации комплекса не происходило, в отличие от комплекса PARP1–ДНК. Снижение эффективности комплексообразования может быть вызвано снижением сродства XPC-RAD23В к ДНК вследствие присоединения к нему отрицательно заряженного PAR либо перераспределением белка между комплексами с ДНК и PAR. Связывание белков репарации с PAR, как свободным, так и присоединенным к PARP1, рассматривается как один из механизмов вовлечения этих белков в соответствующие процессы и их регуляцию (Schreiber et al, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2006, 7, 517). Наличие в XPC PAR-связывающего мотива (Gagne et al, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 6959) позволяет предположить участие такого механизма в регуляции процесса NER.

Проведенный анализ (рис. 17) показал, что XPC-RAD23В связывает свободный фракционированный PAR (рис. 17 а), причем эффективность связывания возрастает с увеличением длины полимера (рис. 17 б). При увеличении длины PAR с 4-6 до 45-50 звеньев ADP-рибозы сродство XPC-RAD23В к нему возрастает в ~16 раз (табл. 6). Кроме того, длинные цепи PAR конкурируют с ДНК за связывание с белком (рис. 17 в).

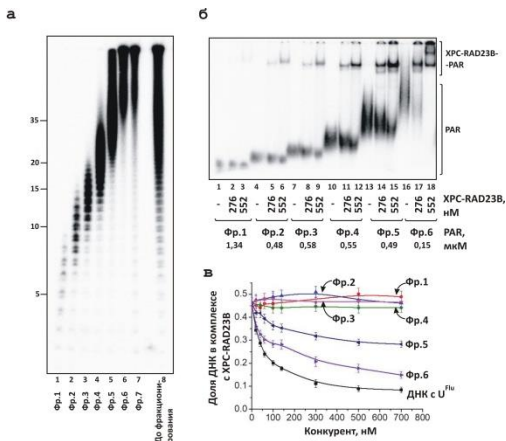


Рис. 17. Анализ длины цепей ^{32}P -PAR, фракционированного на DEAE-Toyopearl 650M (а), связывание XPC-RAD23B с фракциями PAR (б) и конкуренция за связывание с ДНК (в)

Таблица 6. Средство XPC-RAD23B к поли(ADP-рибозе)

Фракция PAR	Средняя длина цепи PAR (число звеньев ADP-рибозы)	K_D , нМ
1	4-6	2000 ± 200
2	11-12	970 ± 90
3	13-14	680 ± 70
4	20-22	650 ± 70
5	32-35	330 ± 30
6	45-50	120 ± 20

5.2. Обе субъединицы XPC-RAD23B подвергаются PAR-илированию

С использованием ^{32}P -NAD⁺ нам удалось также продемонстрировать, что XPC-RAD23B может подвергаться ADP-рибозилированию, катализируемому PARP1 (рис. 18). Поскольку сама PARP1 является мишенью для присоединения PAR, то в условиях PAR-илирования продукты модификации двух полипептидов с близкими молекулярными массами (XPC – 125 и PARP1 – 113 кДа) могут совпадать по электрофоретической подвижности, поэтому в эксперименте использовали как препарат гетеродимера XPC-RAD23B с FLAG-эпитопом (8 аминокислотных остатков) в XPC (рис. 18, 6–8), так и препарат, в котором этот полипептид соединен с MBP (maltose binding protein, 42 кДа) (3–5). Как видно из рисунка, в присутствии XPC-RAD23B набор продуктов

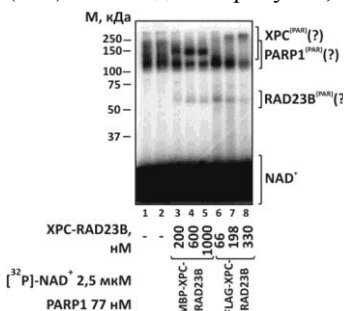


Рис. 18. Поли(ADP-рибозил)ирование белков MBP-XPC-RAD23B и FLAG-XPC-RAD23B.

PAR-илирования изменяется, особенно в случае конъюгата MBP-XPC, для которого наблюдается четкая полоса, соответствующая по молекулярной массе этому полипептиду. Кроме того, во всех исследуемых препаратах наблюдается продукт модификации с молекулярной массой около 60 кДа, соответствующий малой субъединице гетеродимера – RAD23B. Следует заметить, что отдельно взятый полипептид RAD23B не модифицируется PARP1.

В описанном эксперименте использовали низкую концентрацию ^{32}P -NAD⁺, чтобы избежать синтеза длинных цепей PAR, однако в этих условиях наблюдается образование продуктов

автомоодификации PARP1 (рис. 19, 1, 2) с подвижностью, соответствующей XPC (125 кДа). Чтобы определить, действительно ли XPC подвергается PAR-илированию, продукты модификации, полученные в присутствии высоких концентраций нерадиоактивного NAD⁺ (50 и 500 мкМ), разделяли в SDS-ПААГ и окрашивали кумасси (рис. 19 а). Параллельно белки из геля также переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-

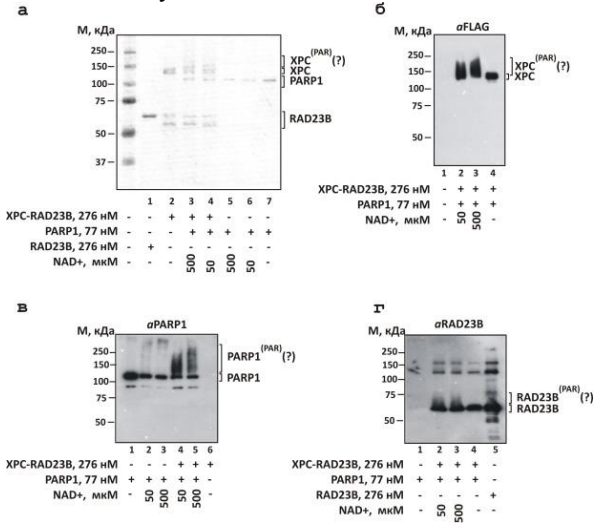
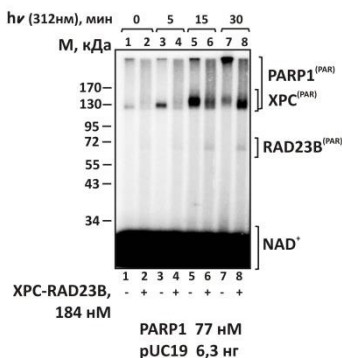


Рис. 19. Анализ продуктов PAR-илирования белков в геле с помощью окрашивания кумасси (а) и антителами против FLAG-пептида, присоединенного к XPC (б), PARP1 (в) и RAD23B (г).

пептида (рис. 19 б), PARP1 (рис. 19 в) и RAD23B (рис. 19 г). Окрашивание кумасси показало, что в условиях синтеза PAR количество исходных полипептидов уменьшается (рис. 19 а, сравнить 1 с 2, 3 для PARP1, 6 с 4, 5 для XPC и 7 с 4, 5 для RAD23B) и появляются размытые полосы с более низкой электрофоретической подвижностью, чем немодифицированный полипептид XPC (рис. 19 а, сравнить 6 с 4, 5). Эти полосы перекрываются с продуктами

модификации XPC (рис. 19 б, 2, 3) и PARP1 (рис. 19 в, 4, 5). Модификации также подвергается RAD23B в составе комплекса с XPC (рис. 19 г, 2, 3). Таким образом, проведенные эксперименты демонстрируют, что обе субъединицы XPC-RAD23B являются мишенями для PAR-илирования, катализируемого PARP1. Поскольку реакция PAR-илирования белков, катализируемая PARP1 в присутствии NAD⁺, индуцируется в ответ на повреждение ДНК, мы проанализировали влияние структуры ДНК и типа повреждения на эффективность PAR-илирования XPC-RAD23B. Эффективность присоединения радиоактивно меченой ADP-рибозы к белку, а также уровень синтеза свободного PAR были значительно выше в присутствии короткого ДНК-дуплекса, чем кольцевой суперскрученной ДНК-плазмиды рUC19. Введение объемного заместителя в ДНК-дуплекс лишь незначительно повышало активность PARP1, по-видимому, за счет

а



б

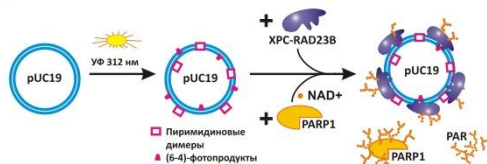


Рис. 20. Зависимость эффективности PAR-илирования XPC-RAD23B от дозы (времени) облучения ДНК УФ-светом (а). Схема УФ-индуцированной модификации XPC-RAD23B (б).

прямую зависимость реакции PAR-илирования, катализируемой PARP1, от наличия в ДНК УФ-индуцированных повреждений, репарируемых системой NER (рис. 20 б). Кроме того, мы обнаружили, что PAR-илирование XPC-RAD23B не приводит к диссоциации этого белка из комплекса с ДНК, хотя и несколько снижает его сродство к ДНК, тогда как в этих же условиях комплексы ДНК с PARP1 практически не образуются. Полученные результаты позволяют предположить, что PAR-илирование XPC-RAD23B регулирует его связывание с поврежденной ДНК: белок остается связанным с ДНК и обеспечивает вовлечение в процесс следующих участников процесса, в то же время его сродство к ДНК снижается, что облегчает диссоциацию белка из комплекса после его формирования. Участие PARP1 в процессе репарации УФ-индуцированных повреждений ДНК показано в экспериментах *in vivo* (Pines et al, *J. Cell. Biol.*, 2012, 199, 235; Robu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2013, 110, 1658).

Исследовано PAR-илирование и взаимодействие с PAR других ключевых факторов NER – XPA и RPA. В отличие от XPC-RAD23B, PAR-илирование XPA значительно снижает эффективность его связывания с ДНК, тогда как сродство RPA к ДНК практически не зависит от присутствия PARP1 и NAD⁺. Кроме того, ни для XPA, ни для RPA не наблюдается изменение электрофоретической подвижности комплексов с ДНК в условиях реакции PAR-илирования, характерное для XPC-RAD23B.

большого вклада концов ДНК в активацию PARP1 по сравнению с объемным повреждением. В то же время, облучение ДНК-плазмиды УФ-светом, индуцирующее возникновение в ДНК повреждений, исправляемых системой NER, приводило к значительному увеличению уровня PAR-илирования XPC-RAD23B и синтеза PAR, зависящему от дозы (времени) облучения (рис. 20 а). В этом случае основной мишенью PAR-илирования становится XPC-RAD23B, тогда как уровень автомодификации PARP1 снижается.

Таким образом, проведенные эксперименты впервые демонстрируют

Исследованные белки связываются с PAR, эффективность связывания увеличивается с увеличением длины этого полимера. XPA содержит неупорядоченные домены, характерные для PAR-связывающих белков. Показано, что взаимодействие XPA с PAR снижает сродство белка к ДНК (King et al, *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 39824). Возможно, XPA диссоциирует из комплекса с ДНК за счет связывания с PAR, присоединенным к PARP1 либо со свободным полимером.

5.3. RPA модулирует активность PARP1 в зависимости от структуры ДНК

С использованием радиоактивно меченного NAD^+ мы показали, что RPA подвергается PAR-илированию, катализируемому PARP1 (рис. 21). Модификация подвергается преимущественно большая субъединица p70, при этом уровень PAR-илирования зависит от структуры ДНК. Кроме того, RPA оказывает влияние на общий уровень синтеза PAR, которое также зависит от структуры ДНК, используемой для активации PARP1. В присутствии оцДНК добавление RPA практически полностью ингибирует синтез PAR (рис. 21 а, 3), тогда как в присутствии ДНК-дуплекса, особенно содержащего разрыв или брешь, RPA заметно стимулирует синтез PAR (рис. 21 а, сравнить 5, 11, 13 с 4, 10, 12; б).

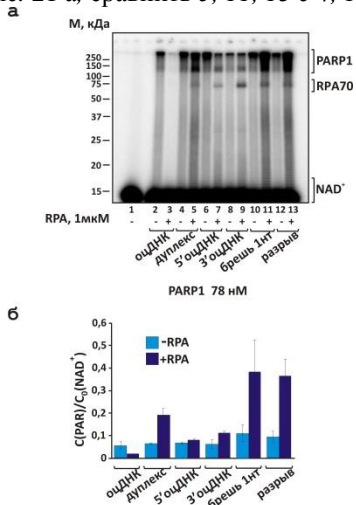


Рис. 21. PAR-илирование RPA в присутствии различных ДНК (а) и влияние на синтез PAR (б)

в белок-белковых взаимодействиях (Chen & Wold, *Bioassays*, 2014, 36, 1156), ориентирован в направлении 5'-конца и в случае ДНК с 3'-выступающим оц участком сближен с PARP1, которая имеет большее сродство к дуплексной части ДНК и, скорее всего, связывается с ее концами (Sukhanova et al, *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44, e60). На ДНК с 5'-выступающим оц участком N-

Заметное PAR-илирование RPA наблюдалось в присутствии частичных ДНК-дуплексов с 3'- или 5'-выступающим оц участком, причем эффективность модификации была значительно выше в случае ДНК с выступающим 3'-концом. Разница в эффективности модификации может определяться взаимной ориентацией активного центра PARP1 и акцепторного участка в RPA при связывании с ДНК. Известно, что RPA связывает оцДНК полярно – четыре основных ДНК-связывающих домена располагаются в направлении от 5'- к 3'-концу (Lavrik et al, *Nucleic Acids Res*, 1999, 27, 4235; Iftode & Borowiec, *Biochemistry*, 2000, 39, 11970; Kolpashchikov et al, *Nucleic Acids Res*, 2001, 29, 373). При такой укладке N-концевой домен RPA70, участвующий

конец RPA70 удален от PARP1 (рис. 22), в результате чего гораздо хуже модифицируется. Можно предположить, что таким образом регулируется участие RPA в процессах репликации и рекомбинации ДНК, протекающих с образованием ДНК-интермедиатов с 5'- и 3'-выступающими оц участками.

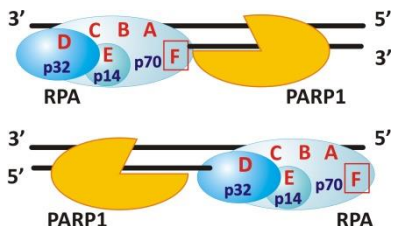


Рис. 22. Расположение RPA и PARP1 на ДНК с 3'- и 5'-выступающими оц участками.

в присутствии RPA количество свободной ДНК, высвобождаемой вследствие PAR-илирования белков, значительно снижалось, а количество ДНК в комплексе с PARP1 возрастало в сравнении с уровнями, наблюдаемыми в отсутствие RPA. Полученные результаты позволяют предположить, что в присутствии RPA увеличивается скорость обмена модифицированного и не модифицированного белка, в пользу чего свидетельствует уменьшение средней длины синтезируемого PAR при увеличении концентрации RPA. Эффект стимуляции является специфическим и сохраняется в присутствии больших избытков ДНК, что свидетельствует о сохранении взаимодействия белков в присутствии ДНК. Более того, можно предположить, что это взаимодействие усиливает активацию PARP1 на ДНК, стимулируя синтез PAR.

Поскольку RPA присутствует в клетке в значительных количествах, можно предположить его участие в регуляции активности PARP1, что, в свою очередь, может играть важную роль в регуляции не только процесса NER, но и репарации, сопряженной с репликацией ДНК, а также других путей репарации.

6. Репарация AP-сайтов в составе кластеров с объемным повреждением – производными бенз[а]пирена

К числу повреждений, удаляемых системой NER, относятся объемные ДНК-аддукты, образуемые реакционноспособными метаболитами полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), содержащихся в продуктах неполного сгорания топлива и отходах производств. Наиболее известный представитель ПАУ – бенз[а]пирен (B[a]P) – обладает цитотоксическими, мутагенными и канцерогенными свойствами. Один из наиболее активных метаболитов B[a]P – 7,8-дигидродиол-9,10-эпоксид (BPDE) – взаимодействует с ДНК с образованием аддукта с пуриновыми основаниями, преимущественно с гуанином. Для производных B[a]P характерна оптическая и конформационная изомерия (рис. 23). В

зависимости от изомерной формы эти производные вызывают разные структурные изменения в ДНК и приводят к различным биологическим эффектам. Показано, что ароматическая группа в (+)-*trans*-BP-*N*²-dG экспонирована в малую бороздку ДНК-дуплекса, тогда как в *cis*-изомере она вовлечена в стэкинг с основаниями ДНК, что приводит к большей дестабилизации двойной спирали, чем в случае *trans*-изомера (Mocquet et al, EMBO J., 2007, 26, 2923).

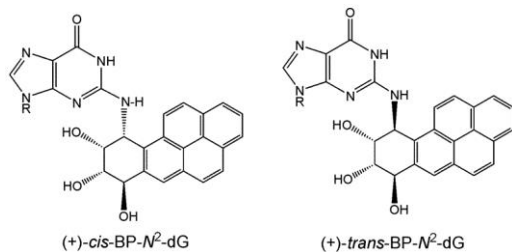


Рис. 23. Структура стереоизомеров ДНК-аддуктов бенз[а]пирена: (+)-*cis*-B[a]P-*N*²-dG - и (+)-*trans*-B[a]P-*N*²-dG.

Искажение двойной спирали ДНК, вызываемое объемным повреждением, приводит к локальному усилению динамических флуктуаций ДНК (Isaacs & Spielmann, DNA Repair, 2004, 3, 455). Это может облегчить доступ к поврежденному участку окисляющих агентов или усилить спонтанный гидролиз гликозидных связей (Gates, Chem. Res. Toxicol., 2009, 22, 1747), увеличивая тем самым вероятность образования апуриновых/апиримидиновых сайтов (AP-сайтов) вблизи объемного аддукта, что, в конечном счете, приводит к образованию кластерного (множественного) повреждения. При репарации таких повреждений требуется точная регуляция последовательности исправления отдельных повреждений во избежание формирования двуцепочечных разрывов, которые более токсичны для клетки, чем разрывы в одной цепи ДНК (Sung & Demple, FEBS J., 2006, 273, 1620). Наиболее благоприятный сценарий в исправлении такого типа повреждений – первоочередное удаление AP-сайта системой BER, поскольку скорость репарации повреждений по этому механизму значительно выше, чем в системе NER (Schärer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2003, 42, 2946).

Таблица 7. Последовательности ДНК-дуплексов, содержащих BP-dG в одной цепи и остаток dU в указанных положениях противоположной цепи.

Обозначение	ДНК-структура (5' - 3')
AP ₋₁ -BP	CTATGGCGAGGCGATTAAGATGGGATGGTATCGGATGGTACGTCAGGGTCTTCCGAACGCAC GATACCGCTCCGCTAATTCTACCCCTACCATCGCTACCATTGCAGTCCCAGAAGGCTTGCTG
AP ₀ -BP	CTATGGCGAGGCGATTAAGATGGGATGGTAGUGATGGTACGTCAGGGTCTTCCGAACGCAC GATACCGCTCCGCTAATTCTACCCCTACCATCGCTACCATTGCAGTCCCAGAAGGCTTGCTG
AP ₊₁ -BP	CTATGGCGAGGCGATTAAGATGGGATGGTAGCATGGTACGTCAGGGTCTTCCGAACGCAC GATACCGCTCCGCTAATTCTACCCCTACCATCGCTACCATTGCAGTCCCAGAAGGCTTGCTG
AP ₊₂ -BP	CTATGGCGAGGCGATTAAGATGGGATGGTAGCGTGGTACGTCAGGGTCTTCCGAACGCAC GATACCGCTCCGCTAATTCTACCCCTACCATCGCTACCATTGCAGTCCCAGAAGGCTTGCTG
AP ₊₃ -BP	CTATGGCGAGGCGATTAAGATGGGATGGTAGCGAUGGTACGTCAGGGTCTTCCGAACGCAC GATACCGCTCCGCTAATTCTACCCCTACCATCGCTACCATTGCAGTCCCAGAAGGCTTGCTG

Здесь, **C** – остаток BP-dGMP, **U** – dUMP, прямоугольником выделены участки, использованные в моделировании.

Мы исследовали возможность репарации AP-сайта в участке напротив объемного повреждения – остатка В[а]Р, присоединенного по экзациклической аминогруппе гуанина (В[а]Р- N^2 -dG, далее ВР-dG), с участием ферментов BER. Были сконструированы 60-звенные ДНК-дуплексы, содержащие (+)*cis*- или (+)*trans*-ВР-dG в одной цепи и остаток урацила в разных положениях противоположной цепи (табл. 7), после выщепления которого урацил-ДНК-гликозилазой генерировался AP-сайт.

6.1. Влияние конформации ВР-dG и взаимного расположения повреждений в кластере на эффективность гидролиза AP-сайта, катализируемого АРЕ1

В первую очередь мы исследовали влияние объемного повреждения на эффективность гидролиза AP-сайта, катализируемого AP-эндонуклеазой 1 (АРЕ1) – ключевым ферментом BER. Наличие объемного аддукта приводило к снижению эффективности гидролиза AP-сайта, при этом величина эффекта зависела от положения AP-сайта относительно ВР-dG и, в меньшей степени, от изомерной формы последнего (рис. 24). Эффективность гидролиза AP-сайта напротив ВР-dG (AP₀) либо смещенного в 5'-направлении цепи (AP₋₁) была несколько ниже, чем в нативном ДНК-дуплексе, однако наблюдаемые различия были в пределах

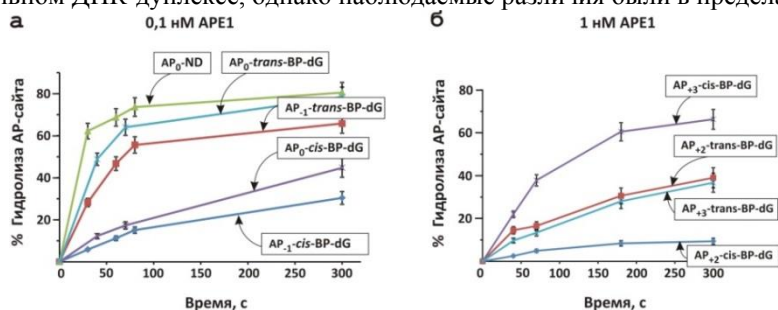


Рис. 24. Кинетические кривые гидролиза AP-сайта в составе ДНК-дуплексов AP₋₁-ВР, AP₀-ВР, AP₀ (контроль), катализируемого 0.1 нМ АРЕ1 (а), и ДНК-дуплексов AP₊₂-ВР и AP₊₃-ВР, катализируемого 1 нМ АРЕ1 (б).

одного порядка (рис. 24 а), тогда как гидролиз AP-сайтов, смещенных в 3'-направлении цепи (AP₊₂ и AP₊₃) наблюдался только при 10-кратном увеличении концентрации фермента (до 1 нМ) (рис. 24 б).

Для всех структур, за исключением AP₊₃-ДНК, более эффективный гидролиз AP-сайта наблюдался в присутствии *trans*-ВР-dG. В случае AP₊₃-ДНК гидролиз AP-сайта был значительно эффективнее, если ВР-dG находился в *cis*-конформации. В целом, разница в ингибировании активности АРЕ1 ВР-dG-аддуктом на анализируемых структурах, определяемая по изменению начальных скоростей реакции, варьировала в диапазоне двух порядков величины.

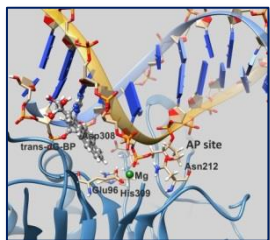
Наиболее сильное влияние ВР-dG на активность АРЕ1 наблюдалось в случае AP₊₁-ДНК, в которой ВР-dG расположен напротив нуклеотида, примыкающего с 5'-стороны к расщепляемой связи. Для расщепления AP-

сайта в данной структуре с эффективностью, близкой к остальным анализируемым ДНК, требовалось повысить концентрацию APE1 до 10 нМ. Кроме того, гидролиз AP-сайта сопровождался последующим выщеплением 3'-концевого нуклеотида за счет 3'→5'-экзонуклеазной активности фермента, более выраженной в случае *cis*-изомера.

Для анализа влияния структурных модуляций ДНК, вносимых BP-dG, на каталитическую активность APE1, было проведено моделирование ДНК-белковых комплексов по методу симуляции молекулярной динамики с помощью программного пакета AMBER 14. В моделировании использовали 12-мерные фрагменты AP₋₁-ДНК и AP₊₃-ДНК (табл. 7, выделены прямоугольниками), содержащие AP-сайт в центральном положении цепи и (+)*cis*- или (+)*trans*-BP-dG-аддукт, смещенный к 5'- или 3'-концу противоположной цепи. Относительное расположение AP-сайта и BP-dG в дуплексе ДНК важно для связывания с APE1, взаимодействующей с AP-сайтом в определенной ориентации и расщепляющей фосфодиэфирную связь с 5'-стороны. Полученные модели демонстрируют, что в AP₋₁-BP-ДНК аддукт BP-dG спарен с dC, прилегающим с 3'-стороны к AP-сайту. В этой позиции остаток BP не оказывает существенного влияния на геометрию каталитического центра APE1 и, следовательно, на эффективность расщепления AP-сайта. При этом *cis*-BP-dG вносит более значительные возмущения в каталитический центр фермента, что приводит к более сильному снижению активности по сравнению с *trans*-изомером.

В дуплексе AP₊₃-BP остаток BP расположен внутри изгиба спирали, вызванного ферментом, и непосредственно связывается с аминокислотами каталитического центра и участвующим в каталитическом акте ионом Mg²⁺ (рис. 25). Важные для каталитической активности APE1 аминокислотные остатки Asp-308 и His-309 расположены вблизи BP-dG. Введение объемного заместителя приводит к изменению расстояний между кислородом карбоксильной группы Asp-308 и Mg²⁺ и между атомом азота His-309 и кислородом фосфатной группы. В комплексе с AP₊₃-BP-ДНК, содержащей *trans*-BP-dG (рис. 25 а), эти расстояния значительно увеличиваются по сравнению с комплексом APE1 с ДНК, содержащей только AP-сайт, что приводит к значительному снижению каталитической активности фермента. Геометрия *cis*-изомера не позволяет ему позиционироваться внутри ДНК-

а



б

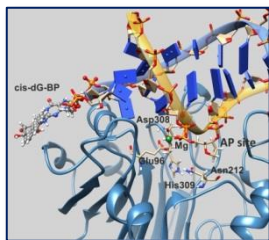


Рис. 25. Структура активного центра APE1 человека с ДНК-дуплексом, содержащим AP-сайт (AP site) в положении +3 относительно (+)*trans*- (а) или (+)*cis*- (б) изомеров BPDE-N²-dG.

белкового комплекса, и для этого аддукта становится энергетически выгодным расположение вне спирали ДНК (рис. 25 б). В этом случае влияние BP-dG на геометрию каталитического центра APЕ1 менее выражено и приводит к менее существенному снижению активности фермента, чем в случае *trans*-BP-dG.

6.2. Ремонтный синтез ДНК на BP-dG-содержащих матрицах, катализируемый ДНК-полимеразами β , λ и ι

Следующий этап репарации AP-сайта – удаление 5'-дезоксирибозофосфата (5'-dRP) и заполнение образовавшейся однонуклеотидной брешы. Основным ферментом, катализирующим эту стадию в BER, является ДНК-полимераза (Pol β), обладающая dRP-лиазной активностью (Matsumoto & Kim, *Science*, 1995, 269, 699). Аналогичными свойствами обладает ДНК-полимераза λ (Pol λ), относящаяся к тому же, что и Pol β , X-семейству (García-Díaz et al, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 34659), а также ДНК-полимераза ι (Pol ι), входящая в Y-семейство (Bebenek et al, *Science*, 2001, 291, 2156; Prasad et al, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 29649). Кроме того, эти полимеразы способны катализировать так называемый транслезионный синтез, т.е. включение нуклеотида напротив повреждения в матрице. Отмеченные свойства позволяют предположить, что эти ферменты способны катализировать синтез ДНК на структурах, содержащих разрыв и объемное повреждение в противоположной цепи.

Мы исследовали влияние изомерной формы BP-dG, его положения относительно разрыва (расщепленного AP-сайта), а также концентраций dNTP, Mg²⁺ и/или Mn²⁺, и ионной силы на активность и специфичность ДНК-полимераз. В ДНК AP₀-BP остаток BP-dG расположен в противоположном от 3'-конца праймера направлении, поэтому все полимеразы специфически встраивали комплементарный нуклеотид в разрыве, хотя и с меньшей эффективностью, чем на неповрежденной матрице, независимо от изомерной формы аддукта.

В случае AP₀-BP-ДНК ремонтный синтез сопряжен с транслезионным, что значительно осложняет процесс и снижает как эффективность реакции, так и ее специфичность, которые в значительной степени зависят от ДНК-полимеразы и состава реакционной смеси. Предварительные эксперименты, проведенные в стандартных для Pol β и Pol λ условиях, показали, что Pol λ селективно включает комплементарный dCTP только напротив *cis*-BP-dG, тогда как Pol β не активна на этих структурах ДНК.

Ранее было показано, что Pol β способна включать правильный нуклеотид напротив *trans*-изомеров BPDE-N⁶-dA и BPDE-N²-dG при высоких (миллимолярных) концентрациях dNTP (Chary et al, *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, 25, 2744). С другой стороны, dNTP в клетках млекопитающих присутствуют в концентрации 1-100 мкМ (Traut, *Mol. Cell. Biochem.*, 1994, 140, 1). Замечено также, что транслезионная активность Pol β и Pol λ более выражена в буфере с низкой ионной силой (Belousova et al, *Biochemistry*,

2010, 49, 4695) и в присутствии ионов Mn^{2+} (Hays & Berdis, *Biochemistry*, 2002, 41, 4771).

Основываясь на перечисленных фактах, мы провели анализ активности Pol β и Pol λ в реакции заполнения бреши напротив BP-dG при физиологических концентрациях dNTP в бессолевом буфере (без NaCl) в присутствии Mg^{2+} и/или Mn^{2+} . Оказалось, что в присутствии Mg^{2+} обе полимеразы катализируют заполнение бреши напротив модифицированного dG только при высокой концентрации dCTP (100 мкМ), тогда как в присутствии Mn^{2+} , как одного, так и в комбинации с Mg^{2+} , синтез происходит при концентрации dCTP 10 мкМ, за исключением Pol β в присутствии 0.1 мМ Mn^{2+} . Pol β менее избирательна в отношении изомерной формы BP-dG, чем Pol λ , которая во всех случаях селективно встраивала нуклеотид только напротив *cis*-BP-dG.

Для более точной оценки влияния ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} на активность Pol λ и Pol β в реакции синтеза ДНК в бреши были определены кинетические параметры реакции включения комплементарного dCTP напротив BP-dG/dG. Полученные значения наглядно показали, что максимальная эффективность реакции, катализируемой Pol λ на поврежденной матрице, достигается при одновременном добавлении Mg^{2+} и Mn^{2+} в концентрации 5 и 1 мМ соответственно (значение k_{cat}/K_M возрастало почти в 4 раза по сравнению с 1 мМ Mn^{2+}), тогда как на неповрежденной матрице фермент более активен в присутствии только Mn^{2+} (1 мМ). Каталитическая эффективность реакции, катализируемой Pol β , во всех случаях была выше на *cis*-BP-dG-содержащей матрице, чем на матрице с *trans*-изомером, и практически не зависела от соотношения концентраций Mg^{2+}/Mn^{2+} .

Активность Pol λ также зависела от концентраций Me^{2+} и их соотношения, а также от конформации BP-dG. Скорость реакции была выше в случае *cis*-BP-dG и возрастала с увеличением концентрации Mn^{2+} , но снижалась с увеличением концентрации Mg^{2+} . Максимальная эффективность реакции в случае изомеров обоих нуклеотидов наблюдалась при совместном присутствии 1 мМ Mn^{2+} и 0.25 мМ Mg^{2+} .

Известно, что замена Mg^{2+} на Mn^{2+} приводит к снижению селективности отбора dNTP ДНК-полимеразами и, как следствие, уменьшению точности синтеза ДНК и увеличению частоты мутаций (Pelletier et al, *Biochemistry*, 1996, 35, 12762; Maga et al, *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 1405; Frank & Woodgate, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 24689). Специфичность включения dNTP каждой из ДНК-полимераз анализировали в присутствии оптимальных концентраций Me^{2+} (1 мМ Mn^{2+} и 5 мМ Mg^{2+} для Pol λ/β , 1 мМ Mn^{2+} и 0.25 мМ Mg^{2+} для Pol λ). Полученные результаты (рис. 26) демонстрируют, что Pol β (а) и Pol λ (б) склонны к ошибочному встраиванию некомплементарных нуклеотидов как напротив модифицированного dG, так и на неповрежденной матрице, тогда как Pol λ (в) способна встраивать только правильный нуклеотид исключительно напротив *cis*-BP-dG, но ошибочна на неповрежденной матрице.

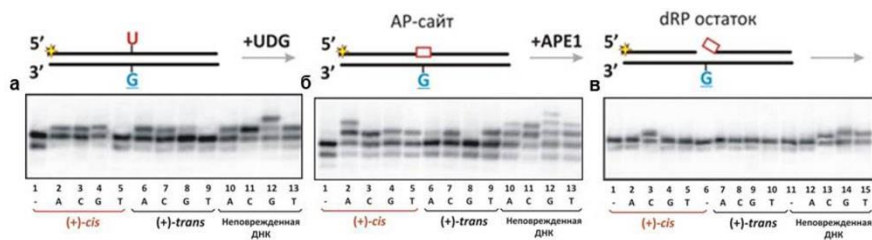


Рис. 26. Активность ДНК-полимераз β (а), λ (б) и ι (в) в реакции заполнения брешей напротив BP-dG.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предположить, что Polλ обладает уникальным свойством – способностью селективно и с высокой точностью заполнять брешь напротив *cis*-BP-dG, что позволяет рассматривать этот фермент в качестве участника репарации AP-сайта в составе кластера с *cis*-BP-dG.

Чтобы объяснить обнаруженную селективность Polλ в отношении *cis*-изомера BP-dG и установить влияние объемного остатка BP-dG, расположенного в области разрыва ДНК, на локализацию аминокислот в активном центре Polλ, мы провели молекулярное моделирование по методу молекулярной динамики комплексов фермента с ДНК-дуплексом, содержащим остаток BP-dG в центральной части дуплекса напротив однонуклеотидной брешки. Комплекс также содержит dCTP, образующий комплементарную пару с BP-dG; трифосфат координирован ионом Mg²⁺ и находится в положении, готовом для реакции включения нуклеотида в цепь ДНК (рис. 27).

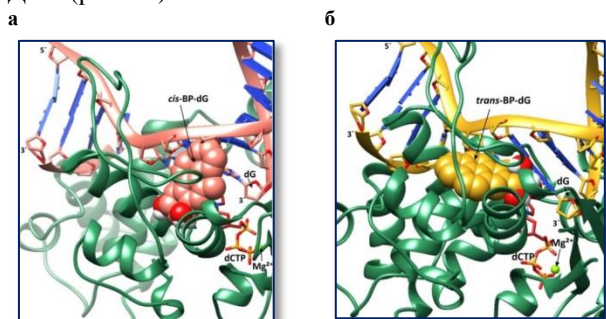


Рис. 27. Расположение остатка бенз(а)пирена относительно α-спиралей Polλ в комплексах с ДНК, содержащей *cis*- (а) или *trans*-BP-dG (б).

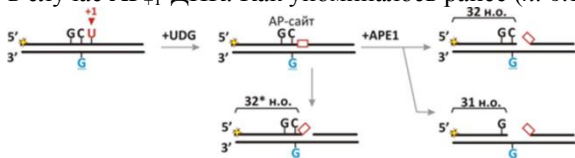
В комплексе Polλ с *cis*-BP-dG-содержащей ДНК остаток BP расположен в цепи ДНК, при этом геометрия комплекса почти не нарушается (рис. 27 а). Остаток BP-dG в *trans*-конфигурации в значительно большей степени нарушает геометрию ДНК-белкового комплекса, т.к. массивный остаток BP внедряется в структуру комплекса Polλ–ДНК в области белковой α-спирали 510-522 (рис. 27 б). Хотя указанные аминокислоты не задействованы в формировании активного центра фермента, влияние может быть опосредовано существенным междоменным

сдвигом, происходящим при формировании каталитически активного состояния, характерным для полимераз X-семейства (*Garcia-Diaz et al, DNA Repair, 2005, 4, 1358; Yamtich & Sweasy, Biochim Biophys Acta, 2010, 1804, 1136; Freudenthal et al, DNA Repair, 2015, 3, 3*). Таким образом, можно предположить, что *trans*-BP-dG препятствует формированию каталитически активного состояния Pol λ в комплексе с ДНК.

6.3. Взаимодействие Pol β и APE1 увеличивает эффективность и точность синтеза ДНК в бреши на поврежденной матрице

В ходе многолетних исследований процесса BER, проводимых, в том числе, и в нашей лаборатории, было установлено физическое и функциональное взаимодействие Pol β и APE1 (*Sukhanova et al, Nucleic Acids Res., 2005, 33, 1222; Liu Y et al, J. Biol. Chem., 2007, 282, 13532; Moor et al, Nucleic Acids Res., 2015, 43, 6009*). Мы сравнили активность Pol β и Pol λ в бреши, образующейся в результате расщепления AP-сайта или сформированной путем гибридизации соответствующих олигонуклеотидов на ДНК-матрице. В результате показано, что в присутствии APE1 повышается эффективность транслезионного синтеза, катализируемого Pol β , тогда как активность Pol λ практически не зависит от присутствия APE1. Независимость репаративного синтеза в брешах, катализируемого Pol λ , от APE1 была отмечена нами ранее (*Lebedeva et al, Biochim Biophys Acta, 2005, 1751, 150*).

Наиболее заметный эффект взаимодействия Pol β и APE1 наблюдался в случае AP₊₁-ДНК. Как упоминалось ранее (п. 6.1.), на такой ДНК



проявляется 3'→5'-экзонуклеазная активность APE1, в результате чего после расщепления AP-сайта происходит

укорочение праймера, особенно заметное на ДНК с *cis*-BP-dG, в этом случае основным продуктом реакции становится 31-мер

(рис. 28 а). При последующем добавлении Pol β удлинение праймера в такой структуре не

наблюдалось вследствие повторного выщепления встроенного нуклеотида, тогда как

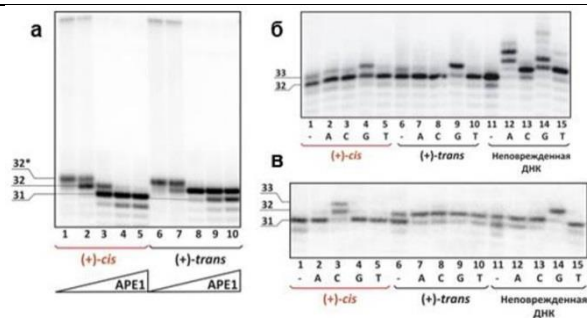


Рис. 28. Pol β ингибирует 3'→5'-экзонуклеазную активность APE1. (а) Расщепление AP-сайта в +1-положении относительно BP-dG, 32* – 32-мер, содержащий 3'-фосфо- α , β -ненасыщенный альдегид (продукт спонтанного расщепления AP-сайта). Включение нуклеотидов в брешь при совместном добавлении APE1 и Pol β (б), APE1 и Pol λ (в).

совместное добавление обоих ферментов приводило к ингибированию экзонуклеазной активности APE1 (рис. 28 б, 1,6), а в присутствии одного из dNTP происходило встраивание только корректного нуклеотида (dG, рис. 28 б, 4,9). В аналогичном эксперименте с Pol λ влияния на активность APE1 не наблюдалось – основным продуктом расщепления AP-сайта в случае *cis*-BP-dG-содержащей ДНК оставался 31-мер (рис. 28 в, 1). В образовавшуюся динуклеотидную брешь Pol λ встраивает два остатка dCTP (рис. 28 в, 3): первый – правильно напротив модифицированного dG и второй – ошибочно по механизму проскальзывания (*Blanca et al, Biochemistry, 2004, 43, 11605*). В случае *trans*-BP-dG образуется однонуклеотидная брешь, 3'-конец праймера в которой дестабилизирован расположенным напротив объемным аддуктом, и Pol λ не способна его удлинить (рис. 28 в, 6-10). Встраивание комплементарного dGTP наблюдается только на неповрежденной ДНК (рис. 28 в, 14). В случае Pol ι удлинение праймера происходило только на неповрежденной матрице. Таким образом, взаимодействие APE1 и Pol β приводит к увеличению эффективности и специфичности репарационного синтеза на поврежденной матрице.

Мы также исследовали влияние остатка BP-dG на заполнение брешей, расположенных в положении +2 и +3, ДНК-полимеразами β , λ и ι , чтобы сравнить влияние дестабилизации 3'-конца праймера, вносимой объемным заместителем в противоположной цепи, на эффективность и точность реакции включения нуклеотидов в брешу, катализируемой этими ферментами.

Проведенные исследования показали, что наименее чувствительна к присутствию объемного аддукта вблизи 3'-конца праймера Pol β , которая включала только правильные нуклеотиды в брешу, образуемые после расщепления AP-сайта в положениях +2 и +3 относительно обоих изомеров BP-dG.

Эффективность и точность синтеза, катализируемого Pol λ , зависели от конформации объемного заместителя. На *cis*-BP-dG-содержащей ДНК Pol λ практически не способна застраивать брешь в положении +2, тогда как на ДНК, содержащей *trans*-BP-dG, наблюдалось включение как комплементарного, так и ошибочных нуклеотидов. На ДНК с брешью в +3-положении и *trans*-BP-dG Pol λ включала только комплементарный нуклеотид, причем дважды, тогда как в случае *cis*-BP-dG-ДНК наблюдалось включение не только комплементарного dT, но и dA.

Pol ι не способна вести синтез в брешу, находящейся в положении +2, тогда как в +3-положение встраивает как корректный dT, так и ошибочные нуклеотиды. Следует заметить, что все исследуемые ДНК-полимеразы проявляли большую точность на BP-dG-содержащей ДНК, чем на неповрежденной матрице.

Таким образом, наличие объемного заместителя в противоположной цепи влияет на эффективность и точность элонгации 3'-конца праймера при заполнении брешу ДНК-полимеразами β , λ и ι даже на удалении 3-х нуклеотидов. Из трех исследованных ферментов Pol ι наиболее

чувствительна к присутствию объемного заместителя в противоположной цепи, а Pol β – наименее чувствительна и может в определенных условиях вести точный синтез в брешах, образованных в результате процессинга повреждений ДНК ферментами BER. Для Pol λ важным является не только удаленность 3'-конца праймера от BP-dG, но и конформация последнего.

Заключение

Репарация ДНК относится к фундаментальным механизмам поддержания целостности генома. К числу основных процессов восстановления ДНК, поврежденной под действием факторов внешней среды и препаратов, применяемых для химиотерапии рака, относится эксцизионная репарация нуклеотидов. В рамках данной работы впервые проведено комплексное исследование процесса NER, включающее анализ топографии комплексов ключевых факторов с поврежденной ДНК на разных этапах процесса, сравнение механизма узнавания повреждений факторами NER дрожжей и высших эукариот, установление роли PARP1 и PAR-илирования белков NER в регуляции их взаимодействия с ДНК.

Полученные результаты внесли заметный вклад в понимание механизма узнавания повреждений ДНК комплексом NER, обеспечивающего универсальность этого процесса в отношении структурно различных повреждений. Установленное методом фотоаффинного мечения взаимодействие фактора первичного узнавания повреждений человека XPC-RAD23B с участком нативной цепи напротив повреждения стало прямым подтверждением данных, полученных методом PCA для дрожжевого ортолога, и позволило сделать вывод об эволюционной консервативности процесса. Определение локализации факторов NER XPA и RPA на поврежденной ДНК, имитирующей интермедиаты разных стадий процесса, показало специфичность взаимодействия этих белков с определенными элементами структуры ДНК и позволило предположить участие XPA в комплексе с RPA не только на этапе формирования предрасщепляющего комплекса, но и на более поздних этапах процесса. Белок XPA является одной из потенциальных мишеней для создания ингибиторов активности системы NER, однако разработка такого подхода требует дальнейших исследований роли этого фактора не только в процессе NER, но и в других клеточных процессах, для предотвращения тяжелых побочных эффектов.

Важную роль в ответе клетки на повреждение ДНК играет PAR-илирование белков, катализируемое PARP1. В представленном исследовании получены прямые доказательства модификации факторов NER в ответ на УФ-индуцированное повреждение ДНК, а также их взаимодействие с синтезируемым полимером ADP-рибозы. Полученные результаты в совокупности с литературными данными позволили предположить универсальную роль PARP1 в качестве регулятора процессов репарации оснований и нуклеотидов ДНК. Данные по влиянию RPA на

активность PARP1, определяемому структурой ДНК, могут свидетельствовать о важной роли взаимодействия этих многофункциональных белков в регуляции не только процесса NER, но и других клеточных процессов.

Наиболее сложными для исправления являются множественные (кластерные) повреждения ДНК. В данной работе проведен детальный анализ репарации одного из наиболее распространенных повреждений ДНК в клетках человека, – AP-сайтов, исправляемых системой BER, в составе кластера с объемным повреждением – производным бенз[*a*]пирена, удаляемым системой NER. Выявленные закономерности позволили установить ключевые факторы, влияющие на активность ферментов BER, AP-эндонуклеазы 1 и репарационных ДНК-полимераз, в процессировании такого типа повреждений. Дальнейшие исследования взаимодействия факторов, участвующих в двух путях эксцизионной репарации, как с ДНК, так и друг с другом и регуляторными белками, позволит установить полный интерактом этих путей репарации и механизмы их регуляции, включая возможность переключения процессов.

В целом, полученные результаты позволяют глубже понять фундаментальные основы функционирования процессов репарации ДНК и механизмов их регуляции и могут быть полезны для разработки новых подходов направленного воздействия на эти системы.

Выводы

1. Впервые показано, что фотореакционноспособные аналоги нуклеотидов 5-{N-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)-транс-3-аминопропенил-1}-2'-дезоксигуанидин-5'-монофосфат (FAP-dUMP) и экзо-N-{2-[N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]аминоэтил}-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат (FAP-dCMP), введенные в ДНК-плазмиды, узнаются и удаляются системой эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) эукариот.

2. Обнаружена прямая корреляция между эффективностью модификации ХРС-RAD23В ДНК-дуплексами, содержащими фотореакционноспособные остатки, и эффективностью выщепления олигонуклеотидов, содержащих фотореакционноспособные группы, системой NER в клеточных экстрактах HeLa. Формирование продуктивной геометрии комплекса ХРС-HR23В с поврежденной ДНК происходит только при наличии нативного участка цепи напротив повреждения. Эффективность взаимодействия ХРС-HR23В с ДНК возрастает при наличии в структуре ДНК неспаренных нуклеотидов.

3. Установлено расположение ХРС-RAD23В на поврежденном ДНК-дуплексе. Впервые показано совпадение мест контакта ХРС-RAD23В и его дрожжевого ортолога Rad4-Rad23 с поврежденной ДНК. Данные по локализации белков, полученные методом фотоаффинной модификации, согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа комплекса Rad4

с фрагментом поврежденной ДНК. Оба белка взаимодействуют преимущественно с участком неповрежденной цепи напротив повреждения, что обеспечивает универсальность узнавания повреждений системой NER.

4. Выявлены места контактов XPA и RPA с частично раскрытым поврежденным ДНК-дуплексом: впервые напрямую показано, что XPA располагается вблизи перехода дц/оцДНК с 5'-стороны от повреждения, а RPA преимущественно контактирует с неповрежденной цепью. Такая посадка может обеспечивать правильное позиционирование специфических эндонуклеаз, осуществляющих вырезание поврежденного участка.

5. Показано, что взаимодействие RPA с ДНК-структурами, моделирующими ДНК-интермедиаты, образующиеся после расщепления поврежденной цепи эндонуклеазой XPF-ERCC1, осуществляется за счет связывания с участком неповрежденной ДНК в бреши. Сродство XPA к такому ДНК-интермедиату значительно ниже, чем к частично открытому дуплексу, при этом тройной комплекс XPA-RPA-ДНК сохраняется. Таким образом, комплекс XPA-RPA может быть вовлечен не только в предрасщепляющий комплекс, но и в последующие стадии NER.

6. Впервые показано поли(ADP-рибозил)ирование обеих субъединиц XPC-RAD23B, катализируемое PARP1. Эффективность модификации XPC-RAD23B прямо коррелирует с интенсивностью (дозой) УФ-облучения, повреждающего ДНК. Исследованные белки NER (XPC-RAD23B, XPA, RPA) связывают свободный PAR и влияют на активность PARP1. Влияние RPA зависит от структуры ДНК, используемой для активации PARP1: RPA практически полностью ингибирует синтез PAR в присутствии оцДНК за счет высокого сродства к ней и стимулирует синтез PAR в присутствии ДНК-дуплекса, содержащего разрыв или брешь. Предложен механизм стимуляции: в присутствии RPA увеличивается скорость обмена модифицированного и не модифицированного PARP1 в комплексе с ДНК, что приводит к повышению уровня синтезируемого PAR одновременно с его укорочением.

7. Установлено, что активность ферментов BER – апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы α (APE1) и β , λ и ι – в репарации AP-сайтов в составе кластеров с объемным повреждением – производным бенз[*a*]пирена (B[a]P- N^2 -dG) – зависит от взаимного расположения повреждений и, в меньшей степени, от конформации объемного аддукта. Ингибирующий эффект B[a]P- N^2 -dG на активность APE1 варьирует в диапазоне двух порядков величины в зависимости от положения AP-сайта относительно объемной группы. Наиболее чувствительна к присутствию B[a]P- N^2 -dG в противоположной цепи ДНК-полимераза ι , наименее чувствительна – ДНК-полимераза β .

8. ДНК-полимераза λ проявляет абсолютную специфичность при заполнении брешы напротив *cis*-изомера BPDE- N^2 -dG, тогда как ДНК-полимеразы β и ι способны преодолевать оба изомера с меньшей точностью. Эффективность и точность синтеза ДНК в брешы на поврежденной матрице, катализируемого Pol β , увеличивается за счет взаимодействия с APE1. Различия в специфичности ДНК-полимераз в отношении изомеров BPDE- N^2 -dG обусловлено структурными особенностями их комплексов с поврежденной ДНК.

Список публикаций по теме диссертации:

1. **Rechkunova N.I.**, Zhdanova P.V., Lebedeva N.A., Maltseva E.A., Koval V.V., Lavrik O.I. Structural features of DNA polymerases β and λ in complex with benzo[*a*]pyrene-adducted DNA cause a difference in lesion tolerance // DNA Repair (Amst). – 2022. – V. 116. – P. 103353. doi:10.1016/j.dnarep.2022.103353.
2. **Речкунова Н.И.**, Красикова Ю.С., Лаврик О.И. Интерактом систем репарации оснований и нуклеотидов // Молекуляр. биология. – 2021. – Т. 55. – №2. – С. 181–193. doi:10.31857/S0026898421020129.
3. Krasikova Y., **Rechkunova N.**, Lavrik O. Nucleotide Excision Repair: From Molecular Defects to Neurological Abnormalities // Int. J. Mol. Sci. – 2021. V. 22. – P. 6220. doi:10.3390/ijms22126220.
4. **Rechkunova N.I.**, Lavrik O.I. Photoreactive DNA as a Tool to study Replication Protein A Functioning in DNA Replication and Repair // Photochem. Photobiol. – 2020. – V. 96. – P. 440–449. doi:10.1111/php.13222.
5. **Речкунова Н.И.**, Мальцева Е.А., Лаврик О.И. Посттрансляционные модификации белков эксцизионной репарации нуклеотидов и их роль в регуляции процесса // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – №9. – С. 1244–1258. doi:10.1134/S0006297919090037.
6. Maltseva E.A., Krasikova Y.S., Sukhanova M.V., **Rechkunova N.I.**, Lavrik O.I. Replication protein A as a modulator of the poly(ADP-ribose)polymerase 1 activity // DNA Repair (Amst). – 2018. – V. 72. – P. 28–38. doi:10.1016/j.dnarep.2018.09.010.
7. Krasikova Y.S., **Rechkunova N.I.**, Maltseva E.A., Lavrik O.I. RPA and XPA interaction with DNA structures mimicking intermediates of the late stages in nucleotide excision repair // Plos One. – 2018. – V. 13. – P. e0190782. doi:10.1371/journal.pone.0190782.
8. Starostenko L.V., **Rechkunova N.I.**, Lebedeva N.A., Lomzov A.A., Koval V.V., Lavrik O.I. Processing of the abasic sites clustered with the benzo[*a*]pyrene adducts by the base excision repair enzymes // DNA Repair (Amst). – 2017. – V. 50. – P. 43–53. doi:10.1016/j.dnarep.2016.12.007.
9. Старostenko Л.В., Мальцева Е.А., Лебедева Н.А., Пестряков П.Е., Лаврик О.И., **Речкунова Н.И.** Взаимодействие фактора эксцизионной репарации нуклеотидов ХРС-RAD23В с ДНК, содержащей кластерное повреждение – производное бенз[*a*]пирена и апуриновый/апиридиновый сайт // Биохимия. – 2016. – Т. 81. – №3. – С. 350–360. doi:10.1134/S0006297916030056.

10. Красикова Ю.С., **Речкунова Н.И.**, Лаврик О.И. Репликативный белок А – ключевой белок, связывающий одноцепочечную ДНК в клетках эукариот, и его роль в репарации ДНК // Молекуляр. биология. – 2016. – Т. 50. – №5. – С. 735–750. doi:10.7868/S0026898416030083.
11. Maltseva E.A., **Rechkunova N.I.**, Sukhanova M.V., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosyl)ation // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – P. 21811–21820. doi:10.1074/jbc.M115.646638.
12. Мальцева Е.А., **Речкунова Н.И.**, Суханова М.В., Лаврик О.И. Поли-АДФ-рибозилирование фактора эксцизионной репарации нуклеотидов XPC-RAD23B с помощью поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 // Доклады АН. – 2015. – Т. 460. – №3. – С. 352–355. doi:10.7868/S0869565215030275.
13. Мальцева Е.А., Красикова Ю.С., Наегели Х., Лаврик О.И., **Речкунова Н.И.** Влияние точечных замен в минимальном ДНК-связывающем домене фактора пигментной ксеродермы А на взаимодействие с ДНК-интермедиатами эксцизионной репарации нуклеотидов // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – №6. – С. 693–704. doi:10.1134/S000629791406008X
14. Starostenko L.V., **Rechkunova N.I.**, Lebedeva N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. Human DNA polymerases catalyze lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct clustered with an abasic site // DNA Repair (Amst). – 2014. – V. 24C. – P. 1–9. doi:10.1016/j.dnarep.2014.10.005.
15. Krasikova Y.S., **Rechkunova N.I.**, Maltseva E.A., Pestryakov P.E., Petruseva I.O., Sugawara K., Chen X., Min J.-H., Lavrik O.I. Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair // J. Biol. Chem., 2013, 288, 10936–10947. doi: 10.1074/jbc.M112.444026.
16. Krasikova Y.S., **Rechkunova N.I.**, Maltseva E.A., Anarbaev R.O., Pestryakov P.E., Sugawara K., Min J.-H., Lavrik O.I. Human and yeast DNA damage recognition complexes bind with high affinity DNA structures mimicking in size transcription bubble // J. Mol. Recognit. – 2013. – V. 26. – P. 653–661. doi:10.1002/jmr.2308.
17. Скосарева Л.В., Лебедева Н.А., Лаврик О.И., **Речкунова Н.И.** Репарация объемных повреждений ДНК – производных полициклических ароматических углеводородов // Молекуляр. биология. – 2013. – Т. 47. – №5. – С. 731–742.
18. Skosareva L.V., Lebedeva N.A., **Rechkunova N.I.**, Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. Human DNA polymerase λ catalyzes lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct during base excision repair // DNA Repair (Amst). – 2012. – V. 11. – P. 367–373. doi:10.1016/j.dnarep.2012.01.002.
19. Красикова Ю.С., **Речкунова Н.И.**, Мальцева Е.А., Краеску К.Т., Петрусева И.О., Лаврик О.И. Влияние центрина-2 на взаимодействие факторов эксцизионной репарации нуклеотидов с поврежденной ДНК // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – №5. – С. 442–451. doi:10.1134/S0006297912040050.
20. Скосарева Л.В., Лебедева Н.А., **Речкунова Н.И.**, Мальцева Е.А., Пестряков П.Е., Лаврик О.И. Взаимодействие факторов эксцизионной репарации

- нуклеотидов с ДНК, содержащей объемное повреждение и апуриновый/апиримидиновый сайт // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – №5. – С. 648–656. doi:10.1134/S0006297912050136.
21. **Rechkunova N.I.**, Krasikova Y.S., Maltseva E.A., Lavrik O.I. Photoreactive DNA as a tool for studying topography of nucleotide excision repair complex // *Biopolym. Cell.* – 2012. – V. 28. – P. 207–211.
 22. **Речкунова Н.И.**, Красикова Ю.С., Лаврик О.И. Эксицизионная репарация нуклеотидов: узнавание повреждений ДНК и формирование предрасщепляющего комплекса // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – №1. – С. 24–36. doi:10.1134/s0006297911010056.
 23. Neher T.M., **Rechkunova N.I.**, Lavrik O.I., Turchi J.J. Photo-cross-linking of XPC-Rad23B to cisplatin-damaged DNA reveals contacts with both strands of the DNA duplex and spans the DNA adduct // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – P. 669–678. doi:10.1021/bi901575h.
 24. Krasikova Y.S., **Rechkunova N.I.**, Maltseva E.A., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. – P. 8083–8094. doi:10.1093/nar/gkq649.
 25. **Rechkunova N.I.**, Lavrik O.I. Nucleotide excision repair in higher eukaryotes: mechanism of primary damage recognition in global genome repair // *Subcell. Biochem.* – 2010. – V. 50. – P. 251–277. doi:10.1007/978-90-481-3471-7_13.
 26. Maltseva E.A., **Rechkunova N.I.**, Petrusseva I.O., Vermeulen W., Schärer O.D., Lavrik O.I. Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages // *Bioorg. Chem.* – 2008. – V. 36. – P. 77–84. doi:10.1016/j.bioorg.2007.11.004.
 27. Красикова Ю.С., **Речкунова Н.И.**, Мальцева Е.А., Петруссева И.О., Сильников В.Н., Зацепин Т.С., Орецкая Т.С., Лаврик О.И. Взаимодействие факторов эксцизионной репарации нуклеотидов XPC-HR23B, XPA и RPA с поврежденной ДНК // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – №8. – С. 1101–1113. doi:10.1134/s0006297908080063.
 28. Штыгашева А.А., Белоусова Е.А., **Речкунова Н.И.**, Лебедева Н.А., Лаврик О.И. ДНК полимеразы β и λ как потенциальные участники системы синтеза через повреждение в процессе репликации отстающей цепи геномной ДНК // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – №11. – С. 1504–1512. doi:10.1134/s0006297908110060.
 29. **Речкунова Н.И.**, Мальцева Е.А., Лаврик О.И. Эксицизионная репарация нуклеотидов у высших эукариот: механизм первичного узнавания повреждений ДНК // Молекуляр. биология. – 2008. – Т. 42. – №1. – С. 24–31.
 30. Maltseva E.A., **Rechkunova N.I.**, Gillet L.C., Petrusseva I.O., Schärer O.D., Lavrik O.I. Crosslinking of the NER damage recognition proteins XPC-HR23B, XPA and RPA to photoreactive probes that mimic DNA damages // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1770. – P. 781–789. doi:10.1016/j.bbagen.2007.01.007.
 31. Мальцева Е.А., **Речкунова Н.И.**, Петруссева И.О., Сильников В.Н., Вермеулен В., Лаврик О.И. Взаимодействие факторов эксцизионной

репарации нуклеотидов RPA и XPA с ДНК, содержащей объемные фотореакционноспособные группы, имитирующие повреждения // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – №3. – С. 342–352. doi:10.1134/s0006297906030060.

32. Lebedeva N.A., **Rechkunova N.I.**, Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., Favre A., Blanco L., Lavrik O.I. Comparison of functional properties of mammalian DNA polymerase lambda and DNA polymerase beta in reactions of DNA synthesis related to DNA repair // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1751. – P. 150–158. doi:10.1016/j.bbapap.2005.05.012.
33. Лебедева Н.А., Мальцева Е.А., Гарипова И.Ю., Васильева С.В., Белоусова Е.А., Петрусева И.О., **Речкунова Н.И.**, Сильников В.Н., Лаврик О.И. Исследование взаимодействия репликативного белка А с фотоактивными структурами ДНК // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – №2. – С. 260–269. doi:10.1023/b:biry.0000018953.00369.33.